

Dynamische Regulation von Differenzierungsmarkern in murinen Melanom-Zelllinien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Eva-Maria Charlotte Matthaei, geb. Pröpper

aus Kassel

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Jennifer Landsberg
2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Annkristin Heine

Tag der Mündlichen Prüfung: 29.12.2022

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès. Sci. Thomas Bieber

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
1.1 Das fortgeschrittene Melanom als therapeutische Herausforderung	6
1.2 Modelle der Tumorentstehung und -progression: Stammzellen vs. Heterogenität	8
1.3 Regulation der phänotypischen Plastizität.....	9
1.4 Ziele und Hypothesen der Arbeit	10
2. Material und Methoden	12
2.1 Verwendete Substanzen	12
2.1.1 Lösungen und Puffer.....	12
2.1.2 Chemikalien und Reagentien	13
2.1.3 Kits	14
2.1.4 Zellkulturmedien.....	14
2.1.5 Antikörper Durchflusszytometrie (FACS)	14
2.1.6 Antikörper Immunfluoreszenz.....	15
2.2 Zelllinien und Kulturbedingungen	15
2.3 Limited dilution	17
2.4 Stressinduktion durch proinflammatorische Zytokine	17
2.5 Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika	18
2.6 Durchflusszytometrische Färbungen und Analyse	19
2.7 Immunfluoreszenz.....	19
2.8 Proliferationsassay (Cell Proliferation ELISA, BrdU)	20
2.9 Digitale Fotodokumentation.....	20
2.10 Statistische Analysen	20

3. Ergebnisse	22
3.1 Heterogenität der Melanomzellen bezüglich Morphologie und Pigmentierung, Differenzierung, Wachstumsverhalten und Proliferation (Zellzyklus)	22
3.2 Dynamische Regulation der Differenzierungsmarker und Einflussfaktoren.....	28
3.3 Die Dedifferenzierung der Melanomzellen ist nicht durch Proliferation oder Zell- tod begründet, sondern durch dynamische Differenzierungsmarker- Expression	39
4. Diskussion	43
4.1 Heterogenität der Melanomzelllinien	43
4.2 Modelle der Tumorentstehung und Heterogenität	44
4.3 Regulationsmechanismen exprimierter Antigene / Entdifferenzierung und Therapieresistenz	46
4.4 Relevanz für Klinik und Therapie	48
5. Zusammenfassung	50
6. Abbildungsverzeichnis	51
7. Tabellenverzeichnis	53
8. Literaturverzeichnis	54
9. Danksagung	61

Abkürzungsverzeichnis

Aq. dest.	destilliertes Wasser
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
Cdk4	cyclin dependent kinase 4
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
c-kit	Tyrosinkinase KIT / CD117
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
FACS	fluorescence-activated cell-sorting
Gp100	Glycoprotein 100 / PMEL
HMB-45	human melanoma black 45
IL	Interleukin
LDH	Laktatdehydrogenase
NGFR	Nerve growth factor receptor / p75NTR / CD271
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHC	major histocompatibility complex
MITF	microphthalmia associated transcription factor
PD-1	Programmed Cell Death 1 Protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAS	rat sarcoma
Rpm	Umdrehungen pro Minute
TGF β	transforming growth factor beta
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor alpha
Trp1/2	tyrosinase related protein 1 bzw. 2
UV	ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Das fortgeschrittene Melanom als therapeutische Herausforderung

Das Melanom ist ein bösartiger Tumor der Haut oder Schleimhaut, der von den epidermalen Melanozyten ausgeht. Sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren, UV-Strahlung, insbesondere Sonnenbrand in der Kindheit, stellen ursächliche Faktoren dar (Beddingfield, 2003). Weitere Risikofaktoren sind ein heller Hauttyp, multiple Nävi und Immunsuppression (Rastrelli et al. 2014). In Deutschland beträgt die Inzidenz ca. 20.000 / Jahr und ist in den letzten Jahren stetig angestiegen. Männer und Frauen erkranken etwa gleich häufig, Frauen jedoch im Durchschnitt 8 Jahre früher im Alter von 58 Jahren (Robert-Koch-Institut, 2012). In der Klinik werden superfiziell spreitende, noduläre, lentigo-maligna, akral lentiginöse und nicht klassifizierbare Melanome unterschieden. Ergänzt wird dies durch eine Klassifikation aufgrund molekulargenetischer Merkmale (BRAF-, NRAS-, NF1-, cKIT-Mutation) (Cosgarea 2017). Als entscheidende prognostische Marker gelten die vertikale Eindringtiefe nach Breslow (Breslow 1970), Ulzeration, Satelliten-Metastasen, das Vorhandensein von Lymphknoten-Metastasen, im fortgeschrittenen Melanom Tumorlast, Anzahl und Art von Metastasen und LDH als laborchemischer Marker. Je nach Stadium variiert die Überlebensrate von einem 10 Jahres-Überleben von ca. 95 % im Stadium Ia bis zu einer deutlich eingeschränkten Lebenserwartung bei Auftreten von Fernmetastasen. In fortgeschrittenen Stadien betrug das durchschnittliche Überleben vor der Einführung neuer therapeutischer Strategien nur 6 bis 10 Monate (Soengas und Lowe 2003). Die chirurgische Exzision mit empfohlenem Sicherheitsabstand ist die Therapie der Wahl bei lokal begrenzten Befunden. Weitere angewandte Therapien sind Immun- und zielgerichtete medikamentöse Therapien. Diese kommen adjuvant oder bei disseminierten Melanomen zum Einsatz. Insbesondere durch die Einführung der Kinaseinhibitoren und der Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren konnte eine deutliche Verlängerung der Lebenserwartung in disseminierten Stadien erreicht werden (Luke et al 2017).

Besondere therapeutische Herausforderungen liegen unter anderem in der Heterogenität von Melanomen begründet. Melanome weisen morphologisch, histologisch und genetisch

(BRAF-Mutationen in 50 % der Melanome, NRAS in 20 %, c-KIT in 1 %, PTEN usw.) große Unterschiede auf, sodass konventionelle Therapien an ihre Grenzen stoßen (Flaherty 2012, Udayakumar et al. 2010). Aus diesem Grund galt das metastasierte Melanom lange als unheilbar. In den letzten Jahren wurden jedoch einige neue vielversprechende Therapieansätze entwickelt (Lo und Fisher 2014). Dazu zählen vor allem Immun-Checkpoint-Inhibitoren (z.B. Antikörper gegen CTLA-4 und PD-1), die gezielter die T-Zell-Antwort verstärken, indem sie T-Zell-inhibitorische Signale abschwächen.

Ein anderer Ansatz sind die als „targeted therapies“ bezeichneten Inhibitoren von Signaltransduktionswegen, die das Weiterleiten von Überlebens-Signalen in den Tumorzellen blockieren. In Melanomen betreffen diese zumeist den MAPK-Signalübertragungsweg. Die „targeted therapies“ führen zu einer deutlichen Verlängerung der Lebenszeit, eine Resistenzbildung mit Reaktivierung des MAPK-Weges schränkt aber den Therapieerfolg zumeist ein (McDermott et al. 2014).

Bei den Immuntherapien limitieren vor allem immun-vermittelte Nebenwirkungen, ein primäres nicht-Ansprechen und ebenfalls eine Resistenzbildung den Therapieeffekt. In experimentellen Ansätzen konnte in selektierten Patienten zudem eine Anti-Tumor-Wirkung durch adoptiven T-Zell-Transfer erzielt werden. Hierbei werden hoch-aktive Tumor-spezifische T-Lymphozyten selektiert, ex vivo vermehrt und dem Patienten zurück transplantiert (Parmiani et al. 2007, Rosenberg et al. 2011).

Therapien, die in erster Linie über eine T-Zell-Aktivierung funktionieren, setzen voraus, dass T-Lymphozyten Tumorzellen an Oberflächenmolekülen erkennen. Dies funktioniert über Antigene, die Körperzellen sowie Tumorzellen an MHC-Moleküle gebunden exprimieren (Coulie et al. 2014). Auf Tumorzellen werden verschiedene tumorspezifische und -unspezifische Antigene exprimiert. Häufig entziehen sich jedoch Tumorzellen dieser Erkennung durch das Immunsystem, indem sie die Expression ihrer Zielantigene verändern. Maeurer et al. (1996) beschreiben erstmalig den Verlust oder die Herunterregulation von MHC-Molekülen als einen Mechanismus der T-Zell-Erkennung zu entgehen. Zu den von Tumoren exprimierten Antigenen zählen unter anderem tumorspezifische Antigene, die durch Mutationen entstanden sind (beispielsweise CDK4, Beta-Catenin), die ebenfalls tumorspezifischen sogenannten „Cancer testis“ Antigene (u.a. MAGE), sowie gewebespezifische Antigene mit geringer Tumorspezifität (Coulie et

al. 2014). Zur Gruppe der melanozytären Differenzierungsantigene gehören beispielsweise Tyrosinase und Melan-A/MART-1 (Castelli 2000). Für eine wirksame T-Zell-vermittelte Therapie ohne gravierende Nebenwirkungen müssen demnach tumorspezifische Antigene adressiert werden. Das erste von T-Zellen erkannte Tumorantigen in humanen Melanomen MAGE wurde 1988 von Van der Bruggen et al. (1991) charakterisiert. Ein weiteres wichtiges Antigen, das im Rahmen von familiären Melanomsyndromen charakterisiert worden ist, ist eine Mutation in der Cdk4 (Wölfel 1995). Auch hier stellt ein Verlust von tumorspezifischen und Differenzierungsantigenen einen möglichen Resistenzmechanismus dar.

1.2 Modelle der Tumorentstehung und -progression: Stammzellen vs. Heterogenität

Schon in den 1940er Jahren beobachteten Forscher, dass in Tumorgewebe differenziertes und undifferenziertes Gewebe nebeneinander vorliegen (Nguyen et al. 2012). Es entstand die Idee, dass multipotente Zellen für die Entstehung von Tumoren verantwortlich sind und diese sich klonal vermehren. Nach diesem Konzept können multipotente Stammzellen sich entweder in weitere undifferenzierte Stammzellen teilen oder zu ausdifferenzierenden Zellen werden, die nicht mehr zur weiteren Zellteilung fähig sind. Tumorstammzellen können demnach einen Tumor initiieren, indem sie sich weiter teilen, ohne ihre Selbsterneuerungsfähigkeit zu verlieren (Civenni et al. 2011). 1960 entdeckten Nowell und Hungerford das Philadelphia-chromosom im Zusammenhang mit der chronisch myeloischen Leukämie und bewiesen so erstmals die klonale Abstammung eines Tumors von einer „Tumorstammzelle“ (Nguyen et al. 2012). In den 1980er Jahren konnte die Arbeitsgruppe von Vogelstein zum ersten Mal das „multistep genetic model of tumorigenesis“ in soliden Tumoren (im kolorektalen Karzinom) zeigen. Das bedeutete, dass auch in soliden Tumoren Mutationen in der DNA zur Tumorentstehung führen können. Trotzdem ist bis heute unklar, inwieweit diese Modelle der Tumor-Stammzellen auf die Tumorgenese anwendbar sind und welche weiteren Faktoren eine Rolle spielen. Über die Funktion von Tumorstammzellen in Melanomen wird seit vielen Jahren geforscht und diskutiert (Boiko et al. 2010, Civenni et al. 2011). Um eine Population von Tumorstammzellen in malignen Melanomen zu erkennen, müssten diese Zellen sich in bestimmten Eigenschaften von den übrigen Tumorzellen unterscheiden. Nur diese Tumorzellen dürften im Transplantationsversuch fähig sein, neue Tumoren zu initiieren,

die dann wiederum die Tumorheterogenität des Ursprungs-Tumors entwickeln (differenzierte sowie Tumorstammzellen enthalten), und sie müssten spezifische Oberflächen-Marker exprimieren (Dalerba et al. 2007). Zwar weisen Melanome eine sehr heterogene Zellpopulation auf, deren Zellen sich bezüglich Morphologie, Expression von Oberflächenantigenen (Markern) und Fähigkeit, Tumore zu initiieren, unterscheiden (Held et al. 2010), jedoch konnte bisher keine einheitliche Population definiert werden, die konstant und in verschiedenen Experimenten die Kriterien der Tumorstammzellen erfüllt (Shackleton 2010). Es stellt sich die Frage, inwiefern eine dynamische Antigenexpression mit dem Tumorstammzellmodell vereinbar ist. Zumindest könnten dynamisch von den Melanomzellen regulierbare Antigene nur schwer eine Stammzellpopulation definieren und wären als sogenannte Stammzellmarker unbrauchbar. Als sogenannte Stammzell-assoziierte Marker in Melanomen beschrieben sind zum Beispiel Notch-Rezeptoren, WNTs-Proteine, c-kit/CD117, Nestin, aber auch CD 133 und CD271/NGFR (Pietra et al. 2009).

Anichini et al. beschreiben 1986, dass Heterogenität sowohl zwischen Tumoren verschiedener Patienten als auch innerhalb eines Tumors und in Zellklonen einer Melanomzelllinie vorhanden ist. Antigene werden von Zelllinien heterogen exprimiert und in unterschiedlichem Ausmaß von T-Zellen erkannt (Anichini et al. 1986). Gründe für die Heterogenität innerhalb von Melanomen können genetisch fixierte Mutationen sein, die phänotypisch sichtbare oder funktionale Veränderungen zur Folge haben oder es kann sich um variable epigenetische Veränderungen wie Genregulierung, gewebespezifische Differenzierung und Reaktionen auf das Tumormikromilieu handeln (Mrusyk et al. 2012).

1.3 Regulation der phänotypischen Plastizität

In vorherigen Arbeiten meiner Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Melanomzellen durch inflammatorische Mediatoren (z.B. TNF-alpha) ihre Differenzierungssignatur reversibel verändern können (Landsberg et al. 2012). Diese Reaktion auf Inflammation spricht für eine dynamische Regulation der Differenzierungsmarker. Es stellt sich die Frage, ob andere Stress-induzierende Faktoren ebenfalls eine Veränderung der Differenzierungsmarker in Melanomzellen bewirken können.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Differenzierungsmarker Gp100/Pmel17 und NGFR/CD271 untersucht, die regelmäßig auf Melanomen zu finden sind. Gp100/Pmel17 ist ein spezifisch von Melanomzellen exprimiertes, membrangebundenes Protein, das in der Routine-Diagnostik genutzt wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung der Melanosomen (Melanin-produzierenden Zellorganellen der Melanozyten) (Gould Rothberg et al. 2008). Es wird durch den monoklonalen Mausantikörper HMB45 erkannt, der spezifisch an glykolysiertes gp100 bindet. 73-100 % der primären Melanome und 58-95 % der metastasierten Melanome sind positiv für HMB-45 (Ordonez 2014). NGFR, der Nerve growth factor receptor (auch p75 neurotrophin receptor) gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren, er bindet Neurotrophine und aktiviert eine Tyrosinkinase (Ichim et al. 2012). So nimmt er Einfluss auf Zellmigration, Zellinvasion, Apoptose und Zellüberleben (Jiang et al. 2007). NGFR wird nicht spezifisch von Melanozyten exprimiert. Positiv sind des Weiteren Basalzell-Keratinocyten, Haarfollikel, myoepitheliale Zellen, perivaskuläre Fibroblasten, Nervenstrukturen und einige Nävuszellen (Ordonez 2014). Mikami et al. (2011) beschreiben NGFR als Schlüssel-Regulator für die Differenzierung von Tumorstammzellen.

Letztlich bleibt es somit unklar, ob NGFR als Tumorstammzellmarker herangezogen werden kann, da in mehreren unabhängigen Arbeiten gezeigt wurde, dass er durch äußere Einflüsse bzw. Einflüsse aus dem Tumormikromilieu beeinflusst werden kann (Cheli et al. 2014).

1.4 Ziele und Hypothesen der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Heterogenität verschiedener Melanom-Zelllinien eingehender zu untersuchen und neben proinflammatorischen Stimuli weitere Faktoren zu identifizieren, die den Differenzierungsstatus der Melanom-Zellen beeinflussen können. Dabei wurde von folgenden Hypothesen ausgegangen:

1. Verschiedene Melanom-Zelllinien zeigen einen heterogenen Phänotyp bezüglich Morphologie, Pigmentierung, Wachstumsverhalten und Proliferation.
2. Differenzierungsmarker wie Gp100 und der Neuralzellmarker NGFR werden von den Melanom-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert und können dynamisch reguliert werden.

3. Chemotherapeutika können ähnlich wie TNF einen Stressfaktor darstellen, unter dem die Zellen ihre Differenzierungssignatur dynamisch verändern können. Dabei werden melanozytäre Differenzierungsmarker vermindert und Marker der Neuralleistenzellen NGFR verstärkt exprimiert.
4. Die Dedifferenzierung der Melanomzelllinien unter Chemotherapie ist nicht durch die Selektion eines Subklons bei massivem Zelluntergang oder extremer Proliferation eines fitten Zellklons bedingt. Stattdessen sind Melanomzellen in der Lage, die Differenzierungsmarker dynamisch an- und abzuschalten.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Substanzen

2.1.1 Lösungen und Puffer

1 M Kalziumchloridlösung (1 M CaCl ₂)	5,53 g CaCl ₂ in 50 ml Aqua dest.
DEPC-Wasser	1 ml Diethylpyrocarbonat in 1 l Aqua dest., autoklaviert
FACS-Puffer	0,2 % Na-EDTA 1 % FCS In PBS gelöst
PBS (pH 6,6)	1,375 M NaCl 113 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O In Aqua dest. gelöst und autoklaviert in 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. genutzt
TRIS-Puffer	16,6 g TRIS-Puffer (DAKO) 0,5 ml Tween 20 (Roth) In 1 l Aqua dest.

2.1.2 Chemikalien und Reagentien

Tab. 1: Verwendete Reagentien

Reagens:	Firma:
2-Mercaptoethanol	Amersham
2-Propanolol	Sigma
Aceton	Sigma
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck
DAPI (4,6-Diäidino-2-phenylindol)	Roche
DNase1	Sigma
Doxorubicin	Roth
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	PAA
FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum)	BD Pharmingen
Formalinfreie Zinkfixierung	BD Pharmingen
Geneticin (G418) Sulfate	Santa Cruz Biotechnology
Glycerin	Sigma
Haematoxilin	
HEPES	Roth
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Roth
Kollagenase D	Roche
L-Glutamin	Gibco
Mafosfamide Sodium Salt	Santa Cruz Biotechnology
Natrium-EDTA	Roth
Paclitaxel	
Penicillin	Gibco
PI-Solution (50 µg/ml PI, 50 µg/ml RNase in PBS)	BD Pharmingen
propan-1,3-diol) C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth
TNF α	Peprotech
Trypanblaulösung 0,4 %	Sigma
Tween 20	Sigma

Saponin from Quillaja bark	Sigma
Streptomycin	Invitrogen
Vinblastin	
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)35 %	Merck

2.1.3 Kits

Cell Proliferation Kit II / XTT, Roche

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche

2.1.4 Zellkulturmedien

RPMI 1640

(Roswell Park Memorial Institute Medium)

von Sigma

Lagerung 4 °C

Vor Gebrauch zugeben:

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

20 % (v/v) FCS

1 mM Natriumpyruvat

0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren

2.1.5 Antikörper Durchflusszytometrie (FACS)

Tab. 2: Verwendete Antikörper FACS

Antigen:	Konjugat:	Firma:	Verdünnung:
NGFR	Biotin	BD	1:100
Streptavidin	APC	BD	1:200
CD 16/32	-	BD	1:300

2.1.6 Antikörper Immunfluoreszenz

Tab. 3: Verwendete Antikörper Immunfluoreszenz

Antigen:	Konjugat:	Donor:	Firma:	Verdünnung:
NGFR	Unkonjugiert	Ziege	RD Systems	1:100
Gp100	Unkonjugiert	Kaninchen	Novus	1:100
HMB45	Cy3	Maus	BD	1:1
Streptavidin	Alexa488		BD	1:250
Maus	Cy3		BD	1:250
Kaninchen	Alexa488	Ziege	BD	1:250
DAPI				

2.2 Zelllinien und Kulturbedingungen

Alle verwendeten Zelllinien wurden aus primären oder seriell transplantierten Mausmelanomen von Hgf-CDK4-Mäusen generiert (Tormo, et al., 2006). Auf Grundlage einer CDK4-Mutation (cyclin-dependent-kinase 4) sowie einer Überexpression von HGF entwickeln Hgf-Cdk4-Mäuse spontan pigmentierte Melanome der Haut, die metastasieren.

Die klonierten Zelllinien wurden mit Penicillin, Streptomycin, L-Glutamin und 10 % FCS kultiviert. Die verwendete Zelllinie HCmel3 (Abb. 1) wurde aus einem Hgf-Cdk4 Melanom in Kultur genommen und kloniert.

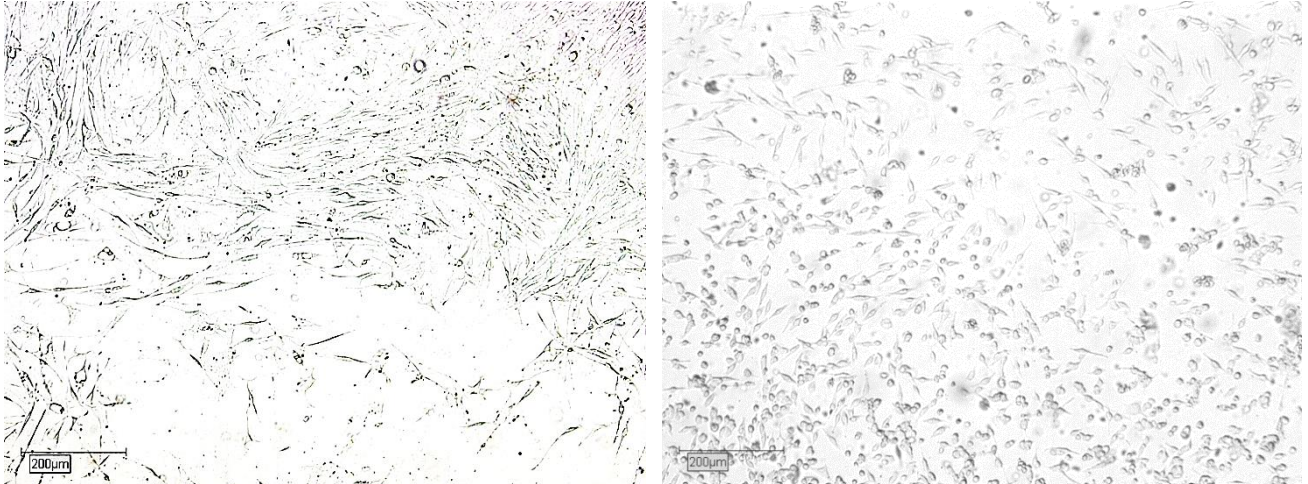


Abb. 1: Zelllinie HCmel-3 (links) und HCmel-12 (rechts) in jeweils 100-facher Vergrößerung.

HCmel-12 (Abb. 1) wurde aus einem seriell transplantierten Hgf-Cdk4 Melanom in Kultur genommen (Landsberg 2012). Die Zelllinien wurden in RPMI mit Penicillin, Streptomycin, L-Glutamin und 10 % FCS kultiviert. Bei Erreichen von Subkonfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gespült, mit 2-5 ml Trypsin abgelöst, 2-5 Minuten bei 37 °C inkubiert, die Reaktion mit Kulturmedium gestoppt und das Zellpellet nach Zentrifugation in frisches Kulturmedium aufgenommen und auf Kulturflaschen verteilt. Mittels einer Einzelzellklonierung wurde versucht, stark pigmentierte Klone (HCmel3 stark pigmentiert) und nicht pigmentierte (helle) Klone zu gewinnen (Abb. 2).

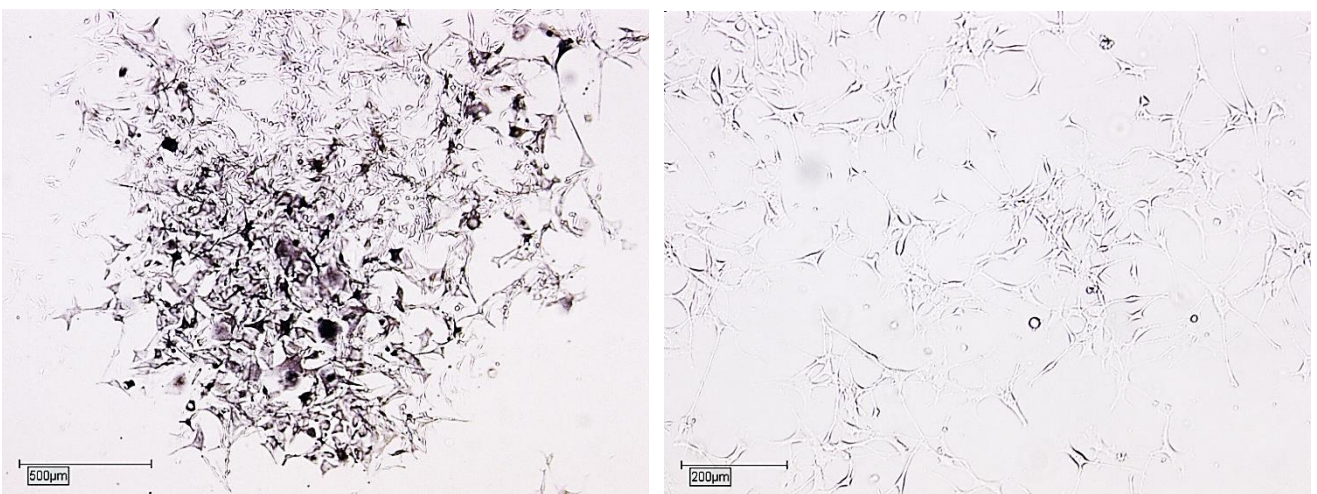


Abb. 2: HCmel-3 pigmentierter (links) und heller Klon (rechts) in 100-facher Vergrößerung.


2.3 Einzelzellklonierung (Limited dilution)

Für die Einzelzellklonierung werden die Zellen gezählt und auf 4500 Zellen/30 ml eingestellt. Sie werden nach dem folgenden Schema (Abb. 3) verdünnt (halblogarithmische Verdünnung):


4500 Zellen

+30 ml PBS  Tube 1 verwerfen



davon 10 ml

+20 ml PBS  Tube 2 verwerfen



davon 10 ml

+20 ml PBS  aus 3 200 µl in ein 96 Well aussäen, ca. 3 Zellen/Well


davon 10 ml

+20 ml PBS  aus 4 200 µl in ein 96 Well aussäen, ca. 1 Zellen/Well


davon 10 ml

+20 ml PBS  aus 5 200 µl in ein 96 Well aussäen, ca. 0,3 Zellen/Well


10 ml verwerfen

Abb. 3: Halblogarithmische Verdünnungsreihe

Wenn genau ein Klon pro Well wächst, wird eine einzelne Kolonie sichtbar, diese wird in eine Kulturflasche überführt und weiter kultiviert.

2.4 Stressinduktion durch proinflammatorische Zytokine

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und 100.000 Zellen in ein 12-Well ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen (12-24 Std.) wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml Medium mit 1000 IU/ml TNF- α bedeckt und über 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dadurch wurden proinflammatorische Bedingungen simuliert.

2.5 Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika

Für die Behandlung der Zellen wurden verschiedene Wirkstoffe verwendet. Mafosfamid ist ein Chemotherapeutikum, das Alkylgruppen in die DNA einfügt und somit zu Strangbrüchen und Mutationen führt und schließlich zum Zelltod. Doxorubicin führt zur Interkalation der DNA, es wird als Zytostatikum eingesetzt. Das Chemotherapeutikum Vinblastin bindet an Tubulin, verhindert die Ausbildung der Mikrotubuli und führt so zur Mitosehemmung. Paclitaxel fungiert ebenfalls als Mitosehemmer, jedoch über eine Hemmung des Abbaus der Mikrotubuli. Bei den genannten Wirkstoffen zeigte sich eine weniger ausgeprägte Dosisabhängigkeit bei der Behandlung der Zellen.

Für die Behandlung wurden die Zellen auf 1×10^6 /ml eingestellt und je 50 μ l davon sowie 2 ml Medium auf ein 6-Well pipettiert (5×10^4 Zellen pro Well). Nachdem die Zellen nach einem Tag angewachsen waren, wurde das Medium abgenommen und entweder mit Medium (Kontrollen) oder mit dem Chemotherapeutikum (Doxorubicin 10 nM / Mafosfamid 1 μ g/ml / Paclitaxel 10 nM / Vinblastin 10 nM) behandelt. Die Zellen wurden über 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen und dem XTT-Assay zugeführt.

Für weitere Versuche wurde Geneticin (G418), das strukturell dem Gentamicin B1 gleicht und zur Gruppe der Aminoglykosidantibiotika gehört, verwendet. Es inhibiert die Polypeptidsynthese, indem es an die Ribosomen bindet, und führt somit zum Zelltod. Geneticin ist ein in der Zellkultur etabliertes Chemotherapeutikum zur Selektion von Zelllinien. In Vorversuchen zeigte es eine gute Dosisabhängigkeit und wurde deshalb in den Versuchen verwendet. Für die Behandlung wurden die Zellen auf 1×10^6 /ml eingestellt und je 50 μ l davon sowie 2 ml Medium auf ein 6-Well pipettiert (5×10^4 Zellen pro Well). Nachdem die Zellen nach einem Tag angewachsen waren, wurde das Medium abgenommen und entweder mit Medium (Kontrollen) mit G418 in niedriger Konzentration (2 μ l/ml) oder hoher Konzentration (5 μ l/ml) behandelt. Die Zellen wurden über 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen und entweder sofortigen Analysen oder der weiteren Kultur über 7 oder 14 Tage zugeführt. Es wurden Fotos, Immunfluoreszenz-Färbungen mit NGFR und HMB45, FACS-Färbungen und Zellzyklusanalysen an Tag 1 nach der Behandlung, an Tag 7 nach der Behandlung und an Tag 14 nach der Behandlung vorgenommen. Das Experiment wurde mehrmals ($n=3$) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

2.6 Durchflusszytometrische Färbungen und Analyse

Für die extrazelluläre NGFR-Färbung wurden 1 Million der Zellen in 5 ml FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen, bei 1000 rpm für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Zellen wurden in FACS-Puffer resuspendiert und 15 Min. inkubiert, mit dem Antikörper CD 16/32 wurden unspezifische Bindungen blockiert. Die Zellen wurden erneut mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Die nächsten Arbeitsschritte erfolgten unter Abdunkelung der Röhrchen. Das verbleibende Zellpellet wurde für 30 Min. bei 7 °C mit der Primär-Antikörper-Lösung inkubiert (NGFR biotiniliert 1:100), erneut gewaschen und zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (APC Streptavidin 1:200) 30 min inkubiert, gewaschen und zentrifugiert. Um die Zellen zu fixieren, wurden sie mit 500 µl Formalin/ Röhrchen 10 Min. bei 4 °C inkubiert, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert.

Für die DNA-Färbung wurde den Zellen zuletzt 500 µl PI-Staining-Solution (8 ml PBS + 40 µl RNase + 200 µl PI) 30 Min. bei 37 °C zugesetzt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Einmessung wurden 250 µl FACS-Puffer/Röhrchen dazu gegeben und resuspendiert. Die Messung erfolgte mit 400 events/sec.

2.7 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden zur Immunfluoreszenz-Färbung auf Coverslides ausgesät und mit Medium oder G418 wie unter 2.4 oder 2.5 beschrieben behandelt.

Zunächst wurden die Zellen mit 500 µl Paraformaldehyd für 10-15 Min. fixiert, danach das Paraformaldehyd abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen.

Für die Färbungen wurden die Zellen zuerst mit 100µl der primären Antikörperlösung (NGFR biotiniliert 1:100 und HMB45 1:100) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden 3x mit TBS-Puffer gewaschen und zunächst mit 100 µl der fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper-Lösung (Streptavidin Cy3 1:200 und Alexa488 1:200) eine Stunde bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Die Kontrollen wurden nur mit der Sekundär-Antikörper-Lösung inkubiert. Die Zellen wurden 3x mit TBS gewaschen. Zur Zellkernfärbung wurden die Zellen 5 Min. mit 300 µl DAPI bei Raumtemperatur und Abdunkelung inkubiert und zweimal mit TBS gewaschen. Die fixierten und gefärbten Zellen wurden mit einem Tropfen Immunfluoreszenzmedium

(Biomed) eingedeckelt und an einem Leica DMLB Mikroskop beurteilt. Die Dokumentation erfolgte mittels Digitalkamera (JVC KY-F75U).

2.8 Proliferationsassay (Cell Proliferation ELISA, BrdU)

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und 100 μ l/Well in ein 96-Well ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C waren die Zellen adhärent und wurden mit 10 μ l/Well BrdU reinkubiert. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, es kann in die Zellen aufgenommen und anstelle von Desoxythymidintriphosphat in neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Nach 2 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 200 μ l/Well FixDenat Solution bei Raumtemperatur fixiert. Nach 30 Minuten wurde FixDenat abgenommen und 100 μ l/Well Antikörper-Lösung (Anti-BrdU-POD) hinzugegeben und für 90 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 250 μ l/Well PBS gewaschen. Die Waschlösung wurde abgenommen und mit 100 μ l/Well Substrat Solution für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde bei 370 nm eingemessen. Der gemessene Wert korreliert mit dem synthetisierten DNA-Gehalt und somit mit der Anzahl proliferierender Zellen in der Multi-Well Platte.

2.9 Digitale Fotodokumentation

Unbehandelte und behandelte Zellen wurden nach 3, 10 und 17 Tagen fotografiert, um makroskopisch und mikroskopisch sichtbare morphologische Unterschiede und Veränderungen durch die Behandlung dokumentieren zu können. Hierzu wurden ein Mikroskop mit Digitalkamera und ein höhenverstellbares Stativ verwendet.

2.10 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden unter Zuhilfenahme des SPSS 25 Computerprogramms mit dem Student-t-Test berechnet. Die Nullhypothese wurde bei einem Signifikanzniveau von 5% abgelehnt ($p < 0,05$). Für die Abbildungen gilt: $p < 0,05$. Die Diagramme wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (Standardabweichung des Mittelwertes = SEM) dargestellt. Für die Untersuchung des Effekts der Medikation mit Geneticin auf die NGFR-Expression zu den Zeitpunkten 3 und 10 Tage wurde ein gemischtes lineares Regressionsmodell für Messwiederholungen berechnet. Die Medikation wurde als fester Effekt berücksichtigt und das Modell adjustiert für den Zeitpunkt der Messung und die Zellreihe. Der Einfluss

der festen Effekte auf die NGFR Expression wurden mittels F-Test getestet. P-Werte kleiner als 0,1 wurden als statistische signifikant bezeichnet. Die Datenpunkte wurden weiterhin graphisch als Boxplots dargestellt, um die Effekte zu visualisieren.

3. Ergebnisse

3.1 Heterogenität der Melanomzellen bezüglich Morphologie und Pigmentierung, Differenzierung, Wachstumsverhalten und Proliferation (Zellzyklus)

Ziel dieser Arbeit war es, Zelllinien, die aus den oben beschriebenen Maus-Melanomen gewonnen wurden, in vitro hinsichtlich Heterogenität auf verschiedenen Ebenen zu charakterisieren.

Viele aktuelle Arbeiten beschäftigen sich mit den Ursachen der Tumorerheterogenität und den daraus resultierenden Therapie-relevanten Schlüssen. Um Gründe bzw. Einflussfaktoren der heterogenen Zellpopulation in Melanomen zu erkennen, sollte im ersten Schritt die morphologische Heterogenität untersucht und dargestellt werden. Bei der Untersuchung von Maus-Melanom-Zelllinien fiel auf, dass die enthaltenen

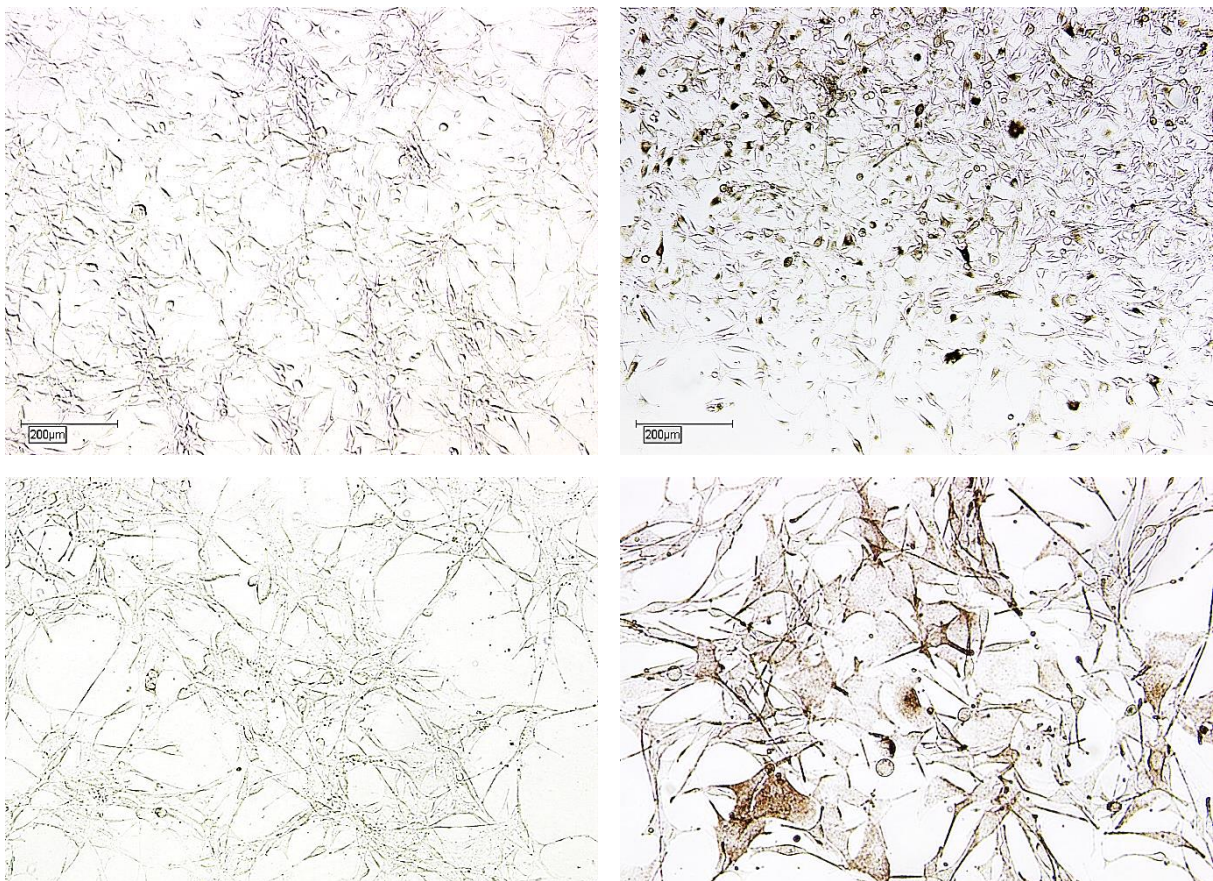


Abb. 4: Leica DMLB Mikroskop: HCmel-3 mit den unterschiedlichen Zellpopulationen, hier nach Einzel-Zell-Klonierung dargestellt (oben in 100-, unten in 400-facher Vergrößerung). Links: Zellen mit rundlicherer Zellform, kaum pigmentiert und mit sternförmigen Ausläufern. Rechts: Zellen mit spindelförmiger Zellform, teils stark pigmentiert.

Zellpopulationen morphologisch sehr heterogen erscheinen. Beurteilt wurden zwei Melanom-Zelllinien, die bereits im Vorfeld im Labor aus Melanomen von Hgf-CDk4 Mäusen etabliert worden waren: Die aus einem primären DMBA-induzierten Hgf-Cdk4 Melanom gewonnene Zelllinie HCmel-3 ist eine makroskopisch pigmentierte, langsamer wachsende Zelllinie (Abb. 4). Die Zelllinie HCmel-12, die aus einem seriell transplantierten Hgf-Cdk4 Melanom gewonnen wurde, stellt im Gegensatz eine makroskopisch nicht sichtbar pigmentierte, schneller proliferierende Zelllinie dar. Wie durch die Einzelzellklonierung verdeutlicht und in Abb. 5 dokumentiert, zeigen die HCmel-3-Zellen zwei morphologisch verschiedene Zellpopulationen. Einige Zellen zeigten spindelförmige Zellkörper mit teils langen Ausläufern, zudem zeigten sie sich mikroskopisch deutlich pigmentiert. Daneben entwickelten sich Zellen mit rundlicherer Zellform, die sich weniger pigmentiert und mit sternförmigen Ausläufern darstellten. Die Zelllinie HCmel-12 zeigt überwiegend monomorphe Zellen mit bidirektionalen Ausläufern, die kaum pigmentiert sind (Abb. 5 rechts).

Die aus diesen Melanomen gewonnenen Tumorzelllinien zeigten in vitro mikroskopische Unterschiede sowohl innerhalb einer Zelllinie als auch untereinander.

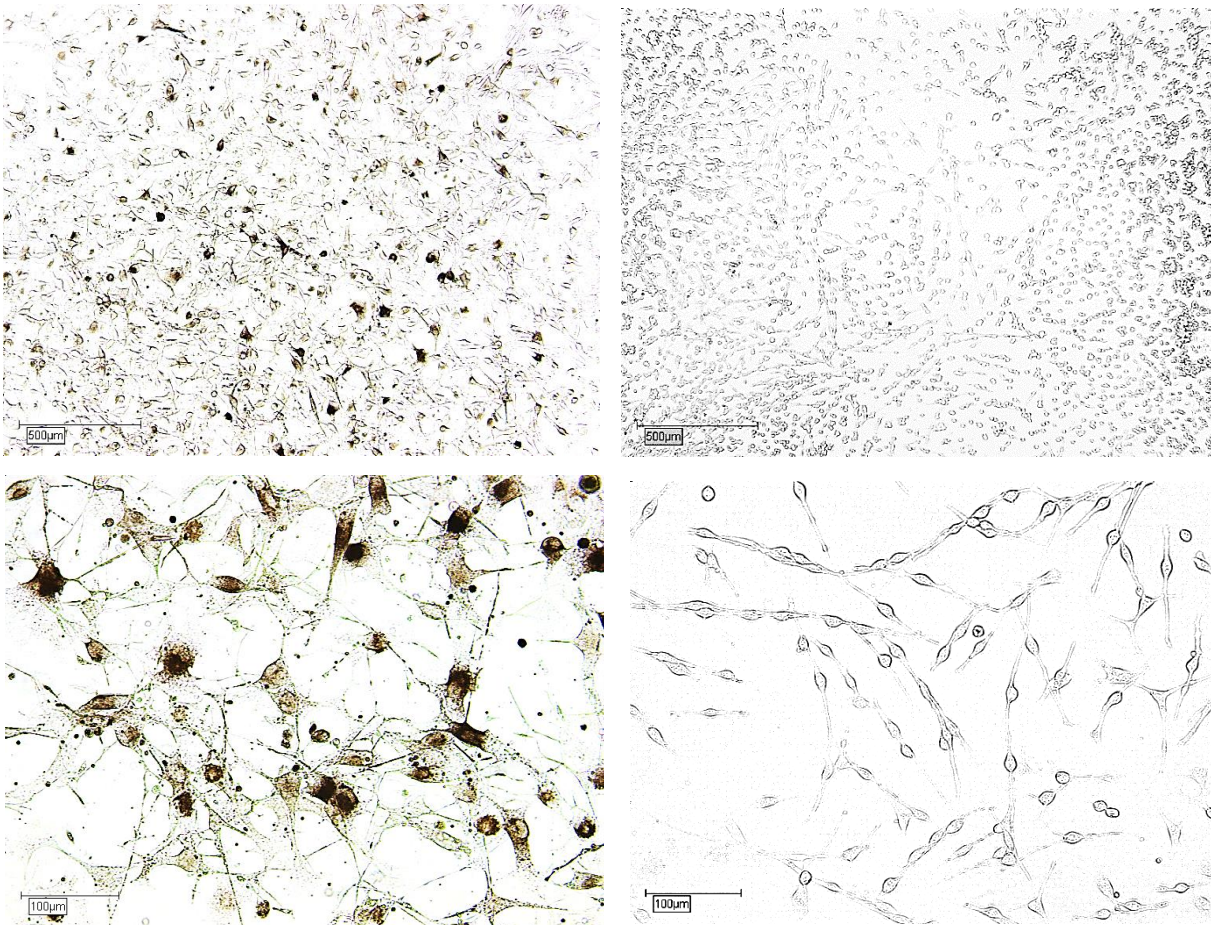


Abb. 5: Unterschiedliche Morphologie (Zellform und Pigmentierung) der Zelllinien HCmel-3 (links) und HCmel-12 (rechts) in 50-facher (oben) und 200-facher Vergrößerung unten).

In der Zellkultur fiel ein unterschiedliches Wachstumsverhalten der Zelllinien HCmel-3 und HCmel-12 auf. Mittels Proliferations-Assay (Abb. 6) ließ sich eine signifikant höhere Proliferationsrate der HCmel-12 Zellen bestätigen ($p < 0,05$).

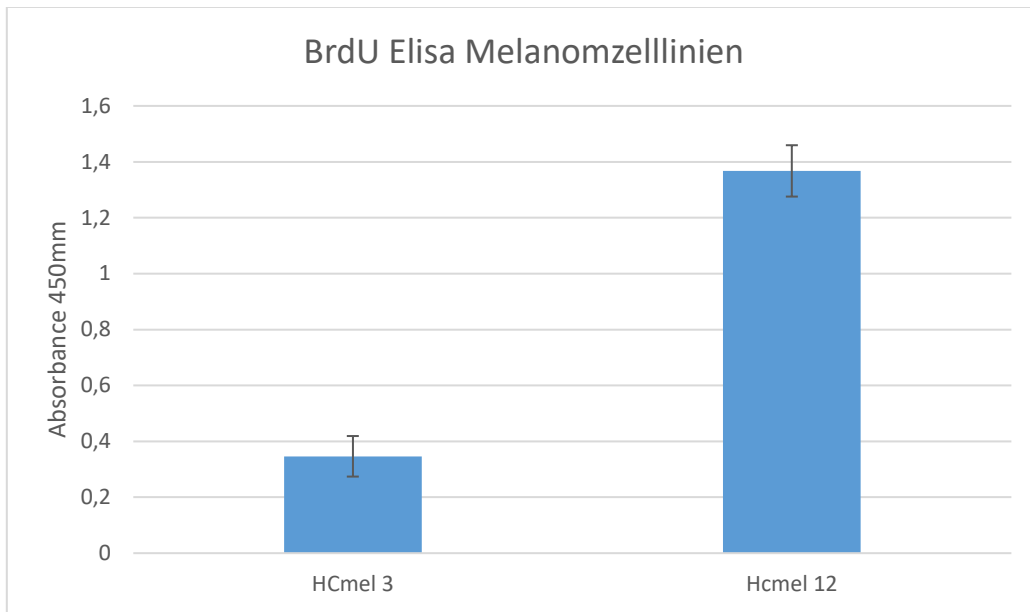


Abb. 6: Proliferations-Assay der Zelllinien HCmel-12 und HCmel-3 im Vergleich, nach 24 Stunden Wachstum. Die Zelllinie HCmel-12 weist eine signifikant höhere Proliferationsrate auf ($p < 0,05$). Es sind die Mittelwerte ($n=4$) mit Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

Ein weiteres Merkmal, in dem sich verschiedene Mausmelanom-Zelllinien unterscheiden, ist die Sensitivität für Inhibitoren. Es zeigte sich für verschiedene Wirkstoffe wie Mafosfamid, Doxorubicin, Vinblastin sowie Paclitaxel, dass die HCmel-12-Zellen im Vergleich deutlich sensitiver auf die Behandlung aller getesteten Wirkstoffe reagieren (Abb. 7).

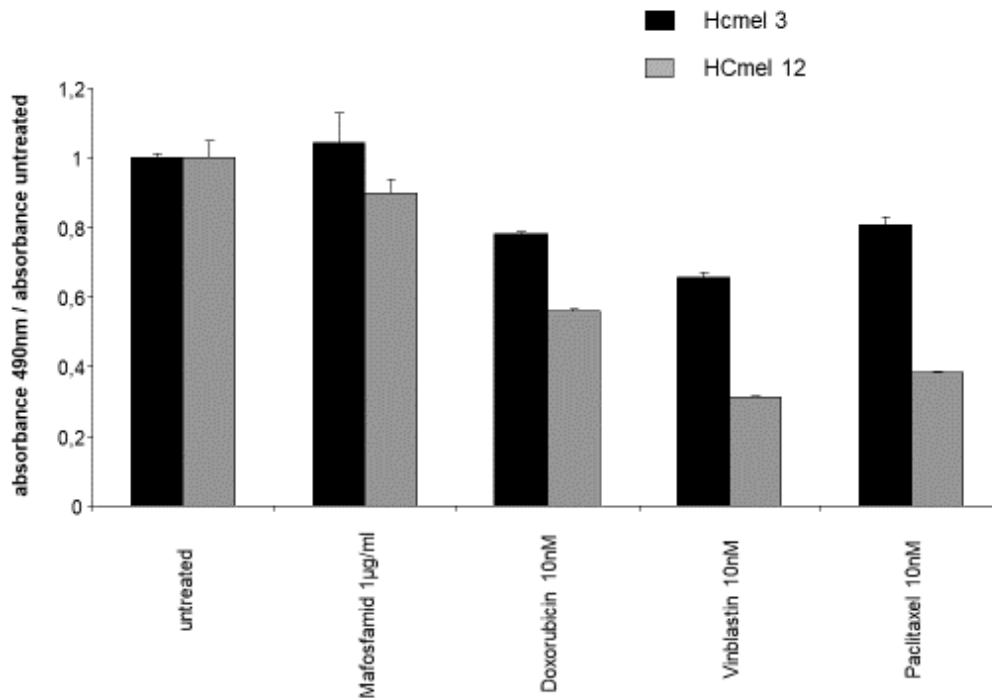


Abb. 7: XTT-Assay zeigt die unterschiedliche Sensitivität der Melanomzelllinien HCmel-3 und HCmel-12 für Mafosfamid, Doxorubicin, Vinblastin und Paclitaxel. Die HCmel-12-Zellen reagieren sensitiver auf die Chemotherapie.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum, um Heterogenität näher zu beschreiben, ist der Differenzierungsstatus. Je nachdem, von welchem Gewebe eine Zelle abstammt, kann sie gewebespezifische Differenzierungsantigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Tumorzellen exprimieren zusätzlich tumorspezifische Antigene oder natürliche Antigene in einer großen Anzahl. In vitro können Differenzierungs-Antigene helfen, makroskopisch nicht sichtbare Unterschiede innerhalb der Tumorzelllinie festzustellen. Hierfür wurden die Zelllinien HCmel-3 und HCmel-12 mittels Immunfluoreszenz auf die Marker Nerve-growth-factor (NGFR) und das melanozytäre Glycopeptid100 (gp100) untersucht.

Der untersuchte Oberflächenmarker NGFR/CD271 wird von Abkömmlingen der Neuralleiste exprimiert und in einigen Arbeiten als Stammzellmarker beschrieben (Civenni et al. 2011 und Boiko et al. 2010). Der weitere untersuchte Oberflächenmarker

Gp100/Pmel17 lässt sich durch den monoklonalen Maus-Antikörper HMB-45 detektieren. Gp100 befindet sich auf nahezu allen differenzierten Zellen melanozytären Ursprungs, wird deshalb als melanozytärer Differenzierungsmarker bezeichnet und in der Pathologie zur Diagnostik von Melanomen verwendet. Beide Marker dienen in Vorarbeiten (Landsberg et al. 2012) der Unterscheidung zwischen wenig differenzierten (NGFR high/ gp100 low) und differenzierten (gp100 high/ NGFR low) Melanom-Zellen. Mittels Immunfluoreszenz wurden qualitative Unterschiede sichtbar gemacht, die FACS-Färbungen ermöglichte im nächsten Schritt eine Quantifizierung der Marker-Expression. Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Zellen mit den primären Antikörpern gegen die Antigene NGFR und Gp100 inkubiert und das Verteilungsmuster mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht. NGFR leuchtet rot (Cy3), Gp100 grün (FITC) und die Zellkerne stellen sich durch die DAPI-Färbung blau dar. Wie in Abb. 8 sichtbar, wird der Differenzierungsmarker NGFR von den untersuchten Zellen heterogen exprimiert, sowohl die HcMel-3-Zellen als auch die HcMel-12-Zellen zeigen in der Immunfluoreszenz-Färbung einige stark positive, einige negative und viele schwach positive Zellen. NGFR wird durch die Lokalisation in der Zellmembran homogen innerhalb der Zelle sichtbar. Auch Gp100 wird unterschiedlich stark von den Melanomzellen exprimiert. Da Gp100 in Vesikeln in der Zelle vorliegt, stellt es sich inhomogen granulär dar. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass innerhalb einer Tumorzelllinie Populationen mit sehr unterschiedlichen Expressionsmustern für Differenzierungsantigene nebeneinander vorliegen.

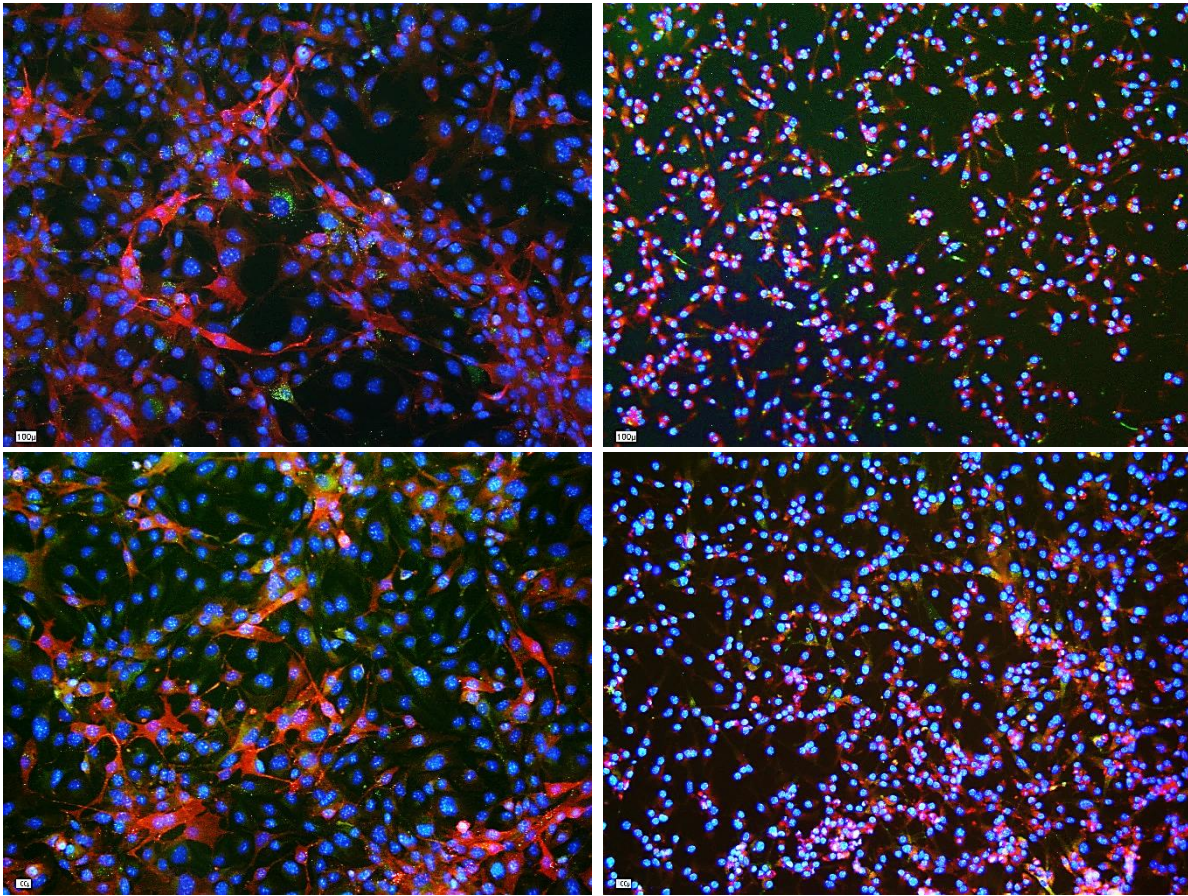


Abb. 8: Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien HCmel-3 (links) und HCmel-12 (rechts) mit Anfärbung von Gp100 (Alexa488-grün) und NGFR (Cy3-rot), Zellkerne (DAPI-blau) in jeweils 100-facher Vergrößerung.

3.2 Dynamische Regulation der Differenzierungsmarker und Einflussfaktoren

Mittlerweile ist bekannt, dass Melanomzellen eine hohe phänotypische Heterogenität aufweisen, die nicht statisch, sondern dynamisch veränderbar ist (Hölzel et al. 2013).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Tumor-Nekrose-Faktor alpha als proinflammatorisches Zytokin die Differenzierungssignatur von Melanomzellen dynamisch reguliert (Landsberg et al. 2012). Eine TNF α -induzierte Dedifferenzierung konnte in Maus- und in humanen Melanomzelllinien beobachtet werden. Dies stellte sich durch einen partiellen Verlust von Gp100 und einer Zunahme spindelförmiger Melanomzellen, die vermehrt NGFR exprimierten, dar (Landsberg et al. 2012). Als

Dedifferenzierung wird hier der Verlust melanozytärer Differenzierungsantigene und die erhöhte Expression von Vorläufer-Markern wie NGFR beschrieben.

Dieses Phänomen konnte ich an meinen Arbeiten in einem ersten Schritt nachvollziehen: In Subpopulationen konnte eine Erhöhung der NGFR-Expression nach TNF-alpha Behandlung dargestellt werden, die sich jedoch nur für die HcMel-12-Zellen signifikant zeigte. Die HcMel-3-Zellen reagieren auf die Zytokin-Behandlung mit einer Hochregulation von NGFR, die HcMel-12-Zellen exprimieren NGFR in fast dreifacher Höhe. In den Histogrammen in Abbildung 9 ist die Erhöhung der NGFR-Expression durch das Zytokin TNF α repräsentativ für mehrere Experimente dargestellt.

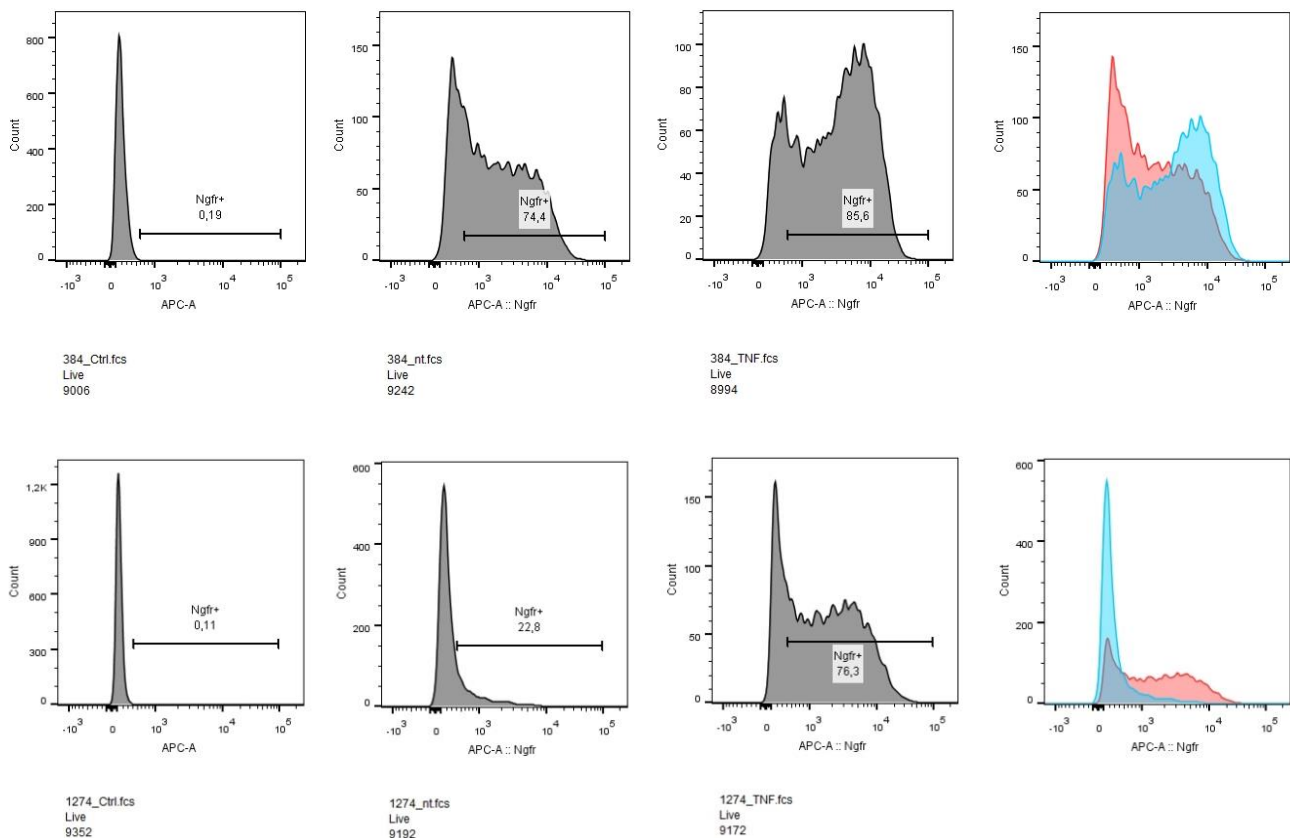


Abb. 9: Durchflusszytometrie: Erhöhung der NGFR-Expression durch TNF-Behandlung (24 Std.) bei den Zelllinien HcMel-3 (oben) ohne Signifikanz und HcMel-12 (unten) mit Signifikanz ($p < 0,05$), ($n = 3$).

Um weitere Einflussfaktoren auf die Regulation der Differenzierungsmarker in vitro zu untersuchen, wurden die Zelllinien mit dem Chemotherapeutikum Geneticin behandelt.

Hierdurch werden Geneticin-resistente Zellen selektiert, die möglicherweise andere Differenzierungsmarker exprimieren als nicht resistente Zellen der Tumor-Zellpopulation. Anhand der Zelllinien HcMel-3 und HcMel-12 und der Marker HMB45 (melanozytärer Differenzierungsmarker) und NGFR (Marker der Neuralleisten-Abkömmlinge/Entdifferenzierung) sollte die veränderte Expression nach der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Geneticin (G418) dargestellt werden. Hierzu wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und an Tag 0 bis auf die Kontrollgruppe (nt) mit Geneticin in unterschiedlicher Konzentration (5µl/ml oder 2µl/ml) behandelt. An Tag 3 wurde das Chemotherapeutikum abgenommen und durch Medium ersetzt. Ein Teil der Zellen wurde für die Immunfluoreszenzfärbungen auf Coverslides fixiert, gefärbt und am Mikroskop beurteilt. Ein anderer Teil wurde für die durchflusszytometrische Untersuchung vorbereitet, gefärbt und eingemessen. Eine weitere Messung erfolgte mit Zellen, die über 10 Tage im Brutschrank inkubiert wurden. Für das Behandlungsschema wurde Geneticin in einer sublethalen Dosis eingesetzt. Das Experiment wurde dreimal unter gleichen Bedingungen wiederholt. Abbildung 10 stellt einen Behandlungsablauf dar.

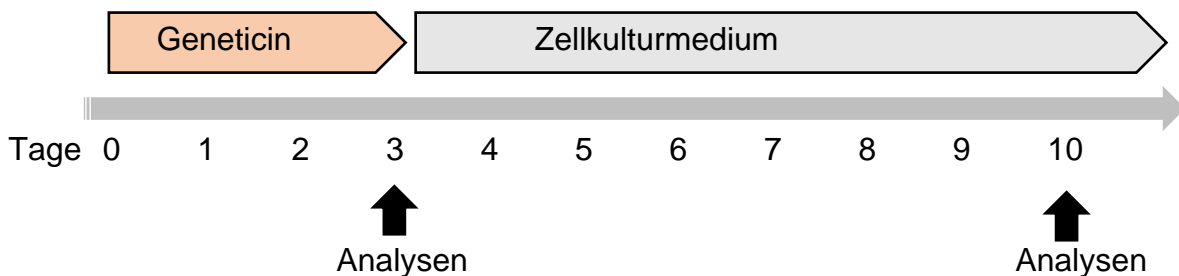


Abb. 10: Schematische Darstellung der Geneticin-Behandlung, Zeitpunkt der Analysen

Die Immunfluoreszenz-Färbungen beider Zelllinien zeigen eine verstärkte NGFR-Expression nach der Geneticin-Behandlung im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Auch verstärkt eine höhere Geneticin-Dosis den Effekt.

Wie in Abbildung 11-16 dargestellt, steigt der Anteil NGFR-positiver Zellen (rot) nach 3-tägiger Geneticin-Behandlung bei beiden Zelllinien. Auch nach 10 Tagen (Abb. 15-16) sind unter der Geneticin-behandelten Zellen mehr NGFR-positive Zellen.

Der Pigmentierungsmarker Gp100 (grün) wird nach der Chemotherapie eher vermindert exprimiert.

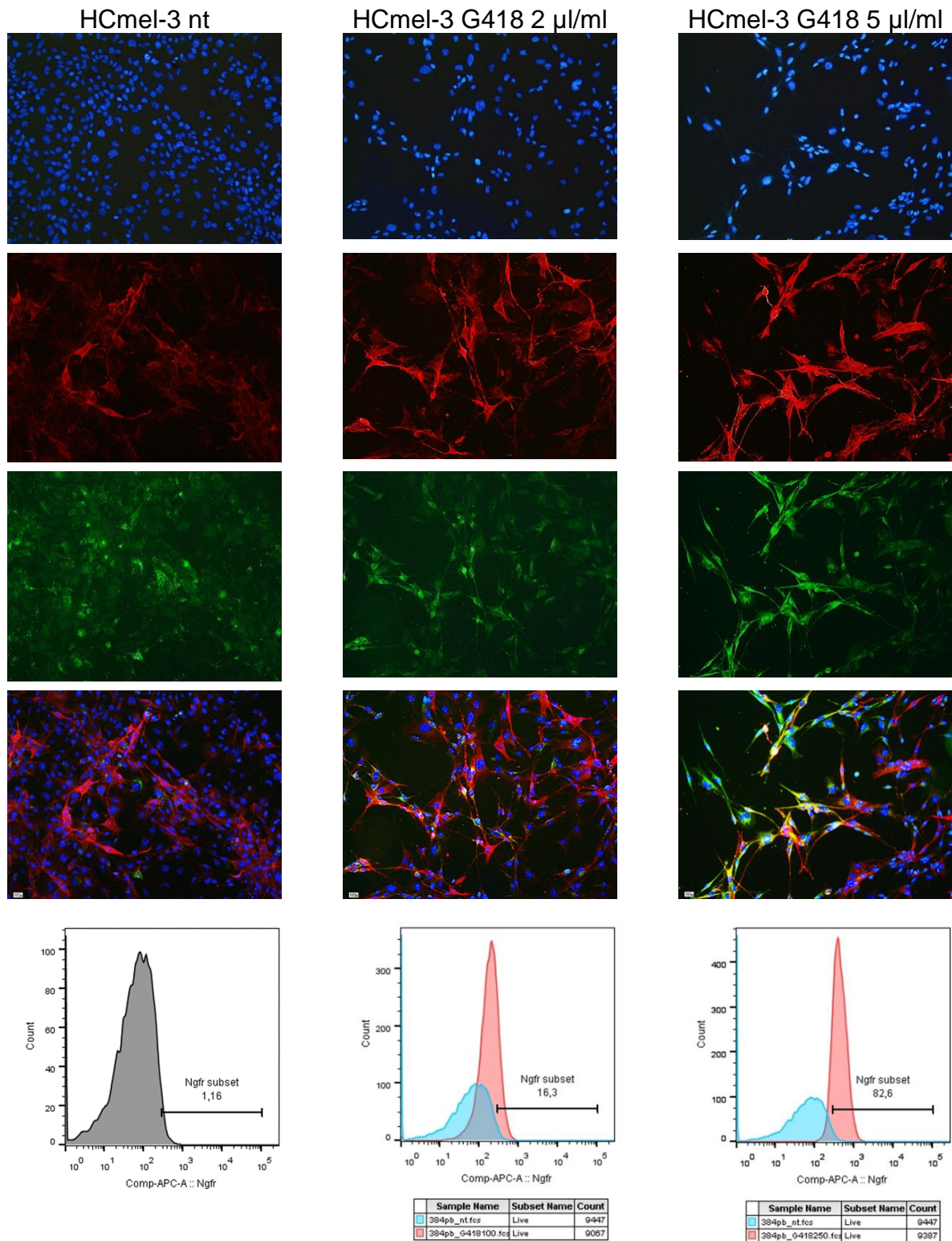


Abb. 11: Zelllinie HCmel-3 nach 3 Tagen Behandlung, oben unbehandelte Kontrolle, mittig Geneticin in Konzentration 2 μ /ml, unten Geneticin Konzentration 5 μ /ml. Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen (NGFR = rot, gp100 = grün, DAPI = blau; jeweils in 100-facher Vergrößerung) und Histogramme der Durchflusszytometrie für NGFR-positive und negative Subpopulationen (Versuch 1).

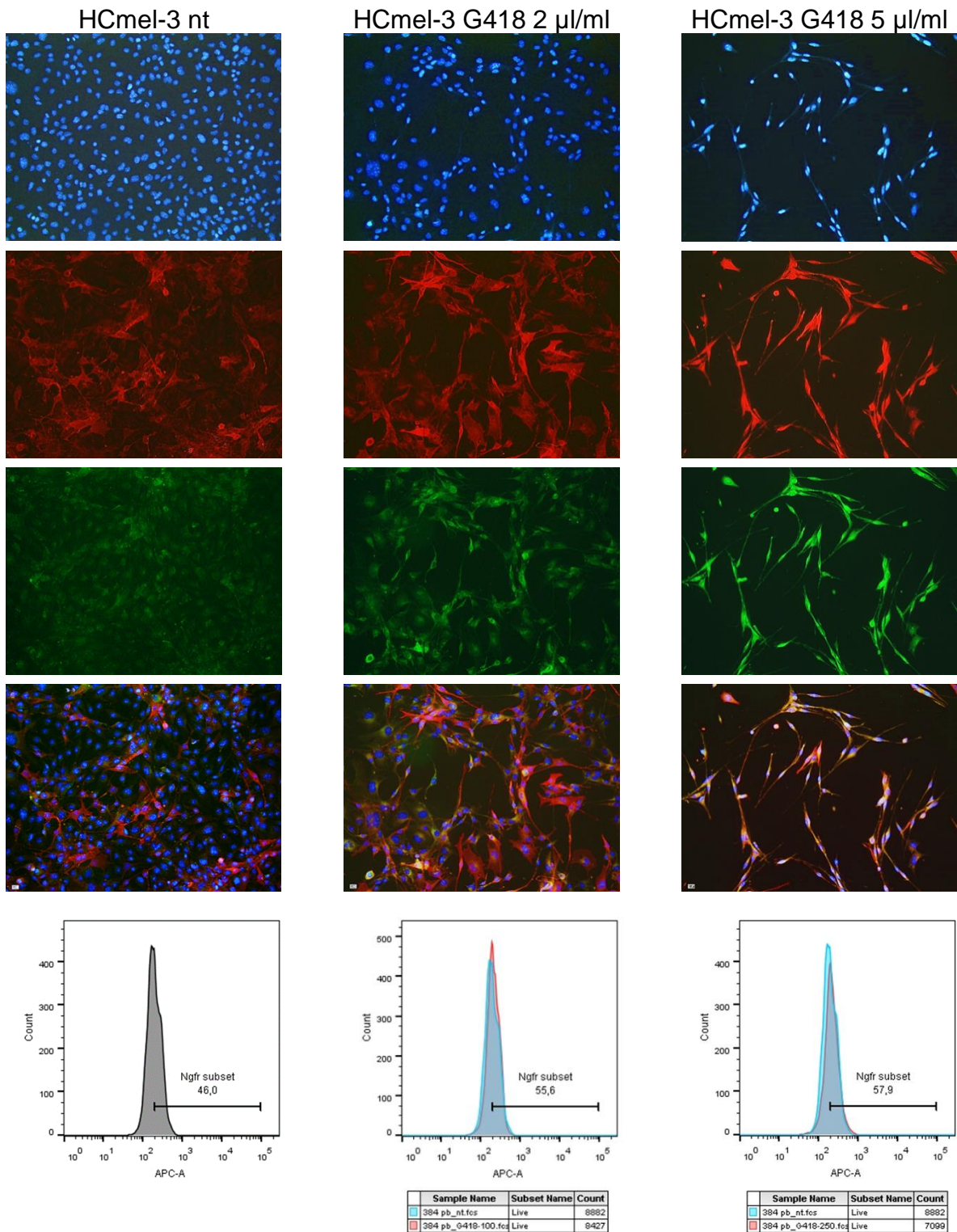


Abb. 12: Zelllinie HCmel-3 nach 3 Tagen Geneticin-Behandlung. Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen (NGFR = rot, gp100 = grün, DAPI = blau; jeweils in 100-facher Vergrößerung) und Histogramme der Durchflusszytometrie für NGFR-positive und negative Subpopulationen (Versuch 2).

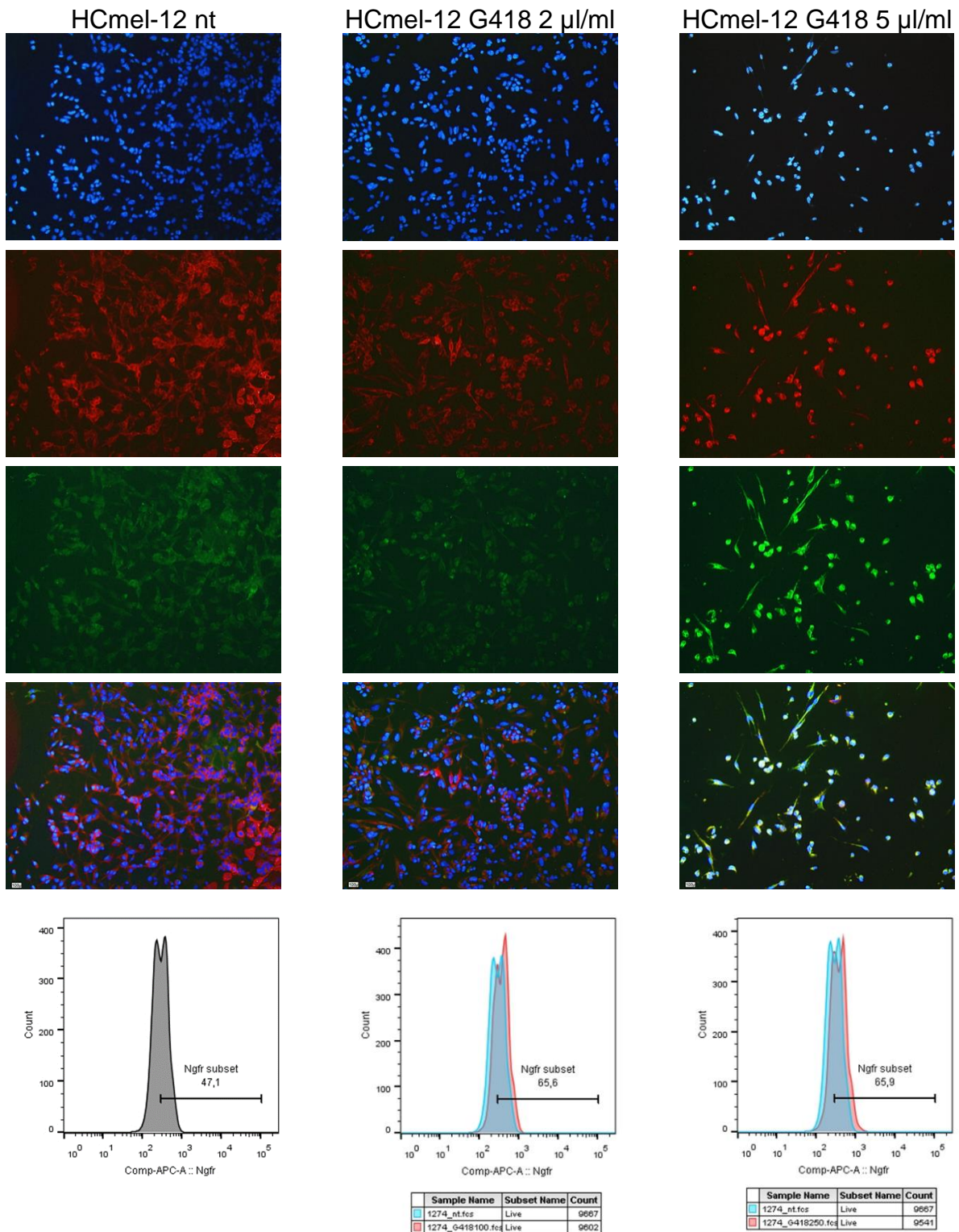


Abb. 13: Zelllinie HCmel-12 nach 3 Tagen Geneticin-Behandlung. Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen (NGFR = rot, gp100 = grün, DAPI = blau; jeweils in 100-facher Vergrößerung) und Histogramme der Durchflusszytometrie für NGFR-positive und negative Subpopulationen (Versuch 1).

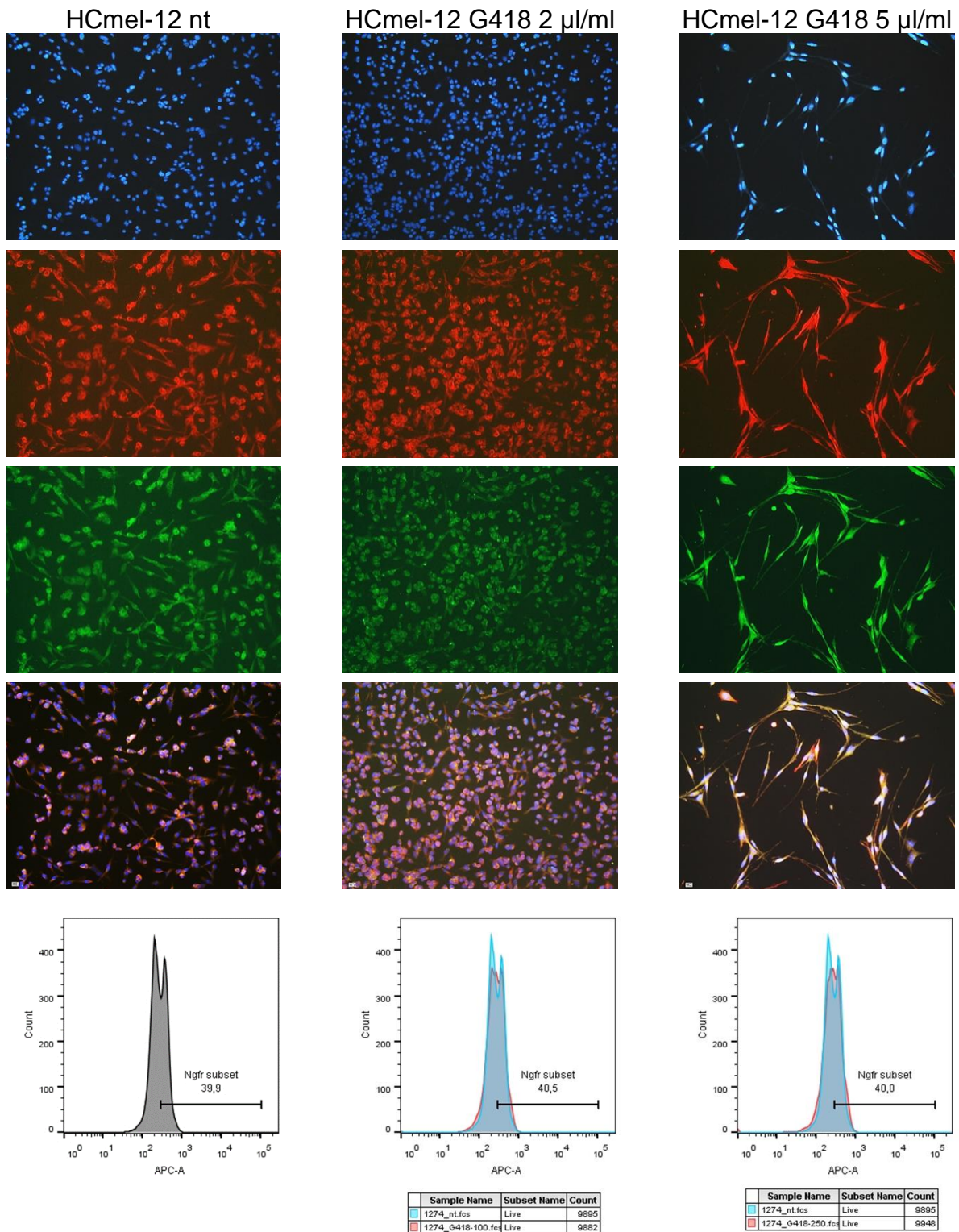


Abb. 14: Zelllinie HCmel-12 nach 3 Tagen Geneticin-Behandlung. Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen (NGFR = rot, gp100 = grün, DAPI = blau; jeweils in 100-facher Vergrößerung) und Histogramme der Durchflusszytometrie für NGFR-positive und negative Subpopulationen (Versuch 3).

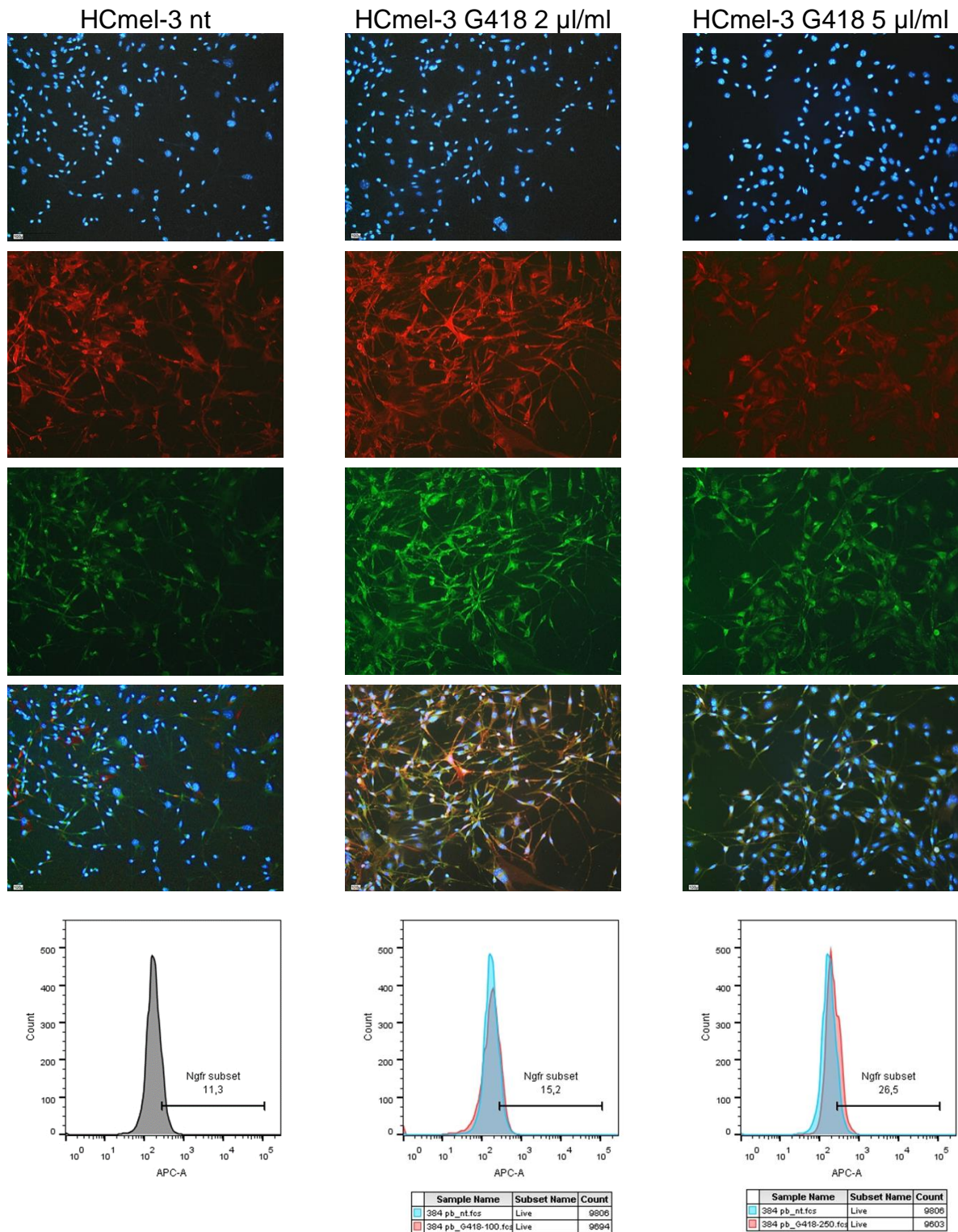


Abb. 15: Zelllinie HCmel-3 nach 10 Tagen Geneticin-Behandlung. Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen (NGFR = rot, gp100 = grün, DAPI = blau; jeweils in 100-facher Vergrößerung) und Histogramme der Durchflusszytometrie für NGFR-positive und negative Subpopulationen (Versuch 1).

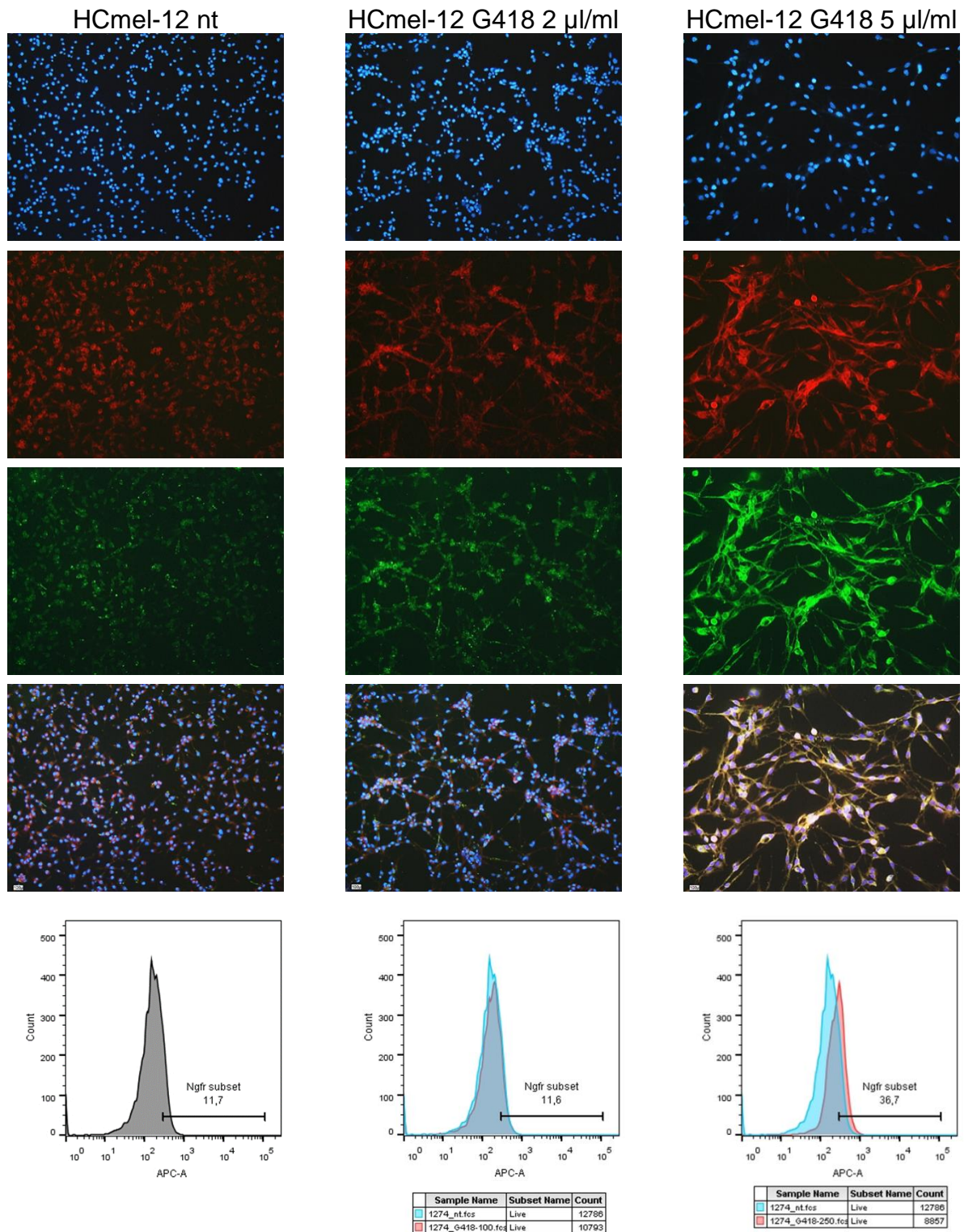


Abb. 16: Zelllinie HCmel-12 nach 10 Tagen Geneticin-Behandlung. Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen (NGFR = rot, gp100 = grün, DAPI = blau; jeweils in 100-facher Vergrößerung) und Histogramme der Durchflusszytometrie für NGFR-positive und negative Subpopulationen (Versuch 1).

Die durchflusszytometrische Untersuchung ermöglicht die Quantifizierung der NGFR-Expression. Wie in Abbildung 11-16 dargestellt und in Abb. 17 zusammengefasst, hat die Medikation einen signifikanten ($\alpha = 0,1$) Einfluss auf die NGFR-Expression (F-Test: $p = 0,09$). In Abhängigkeit von der Konzentration des Chemotherapeutikums zeigt das gemischte lineare Regressionsmodell eine Zunahme der NGFR-Expression (niedrige Konzentration im Vergleich zu keiner Medikation: Zunahme von, im Mittel, 5,25 (95 % KI: -15,00 – 25,49); hohe Konzentration im Vergleich zu keiner Medikation: Zunahme von, im Mittel, 22,67 (95 % KI: 2,43 – 42,91)). Weiterhin hat sowohl die Zelllinie ($\beta(\text{HCmel-3}) = 21,70$, 95 %-KI: 5,17-38,23) als auch der Zeitpunkt der Messung ($\beta(\text{Tag3}) = 23,17$, 95 %-KI: 10,91-35,43) einen signifikanten Effekt auf die NGFR-Expression. Das konditionale R^2 für das gemischte lineare Regressionsmodell liegt bei 60,2 %. Die Ergebnisse des gemischten linearen Regressionsmodells decken sich mit der Darstellung der NGFR-Expression in Abhängigkeit der Zeitpunkte der Messungen, der Medikation und der Zelllinie in Abbildung 17: Mit steigender Konzentration steigt auch die NGFR-Expression in beiden Zelllinien. An Tag 3 scheint die mittlere Expression verglichen mit Tag 10 für alle Konzentrationen höher zu sein und für die Zelllinie HCmel-3 liegt die Expression im Mittel immer etwas höher als für die Zelllinie HCmel-12.

Innerhalb des jeweiligen Experimentes variierte die initiale NGFR-Expression, die Heraufregulation nach Geneticin Exposition zeigte sich jedoch einheitlich ansteigend. Es ist in diesem Zusammenhang wahrscheinlich, dass auch andere Zellkulturbedingungen (Zelldichte, Nährstoffangebot, Hypoxie) zusätzliche Effekte auf die Antigen-Expression der Zellen haben.

Die Ergebnisse zeigen, dass Chemotherapeutika, hier das Aminoglycosid-Antibiotikum Geneticin, ähnlich wie TNF einen Stressfaktor darstellen können, unter dem die Melanomzellen ihre Differenzierungssignatur verändern. Weitere Einflussfaktoren durch die Zellkulturbedingungen wie zum Beispiel Hypoxie müssen zusätzlich beachtet und in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

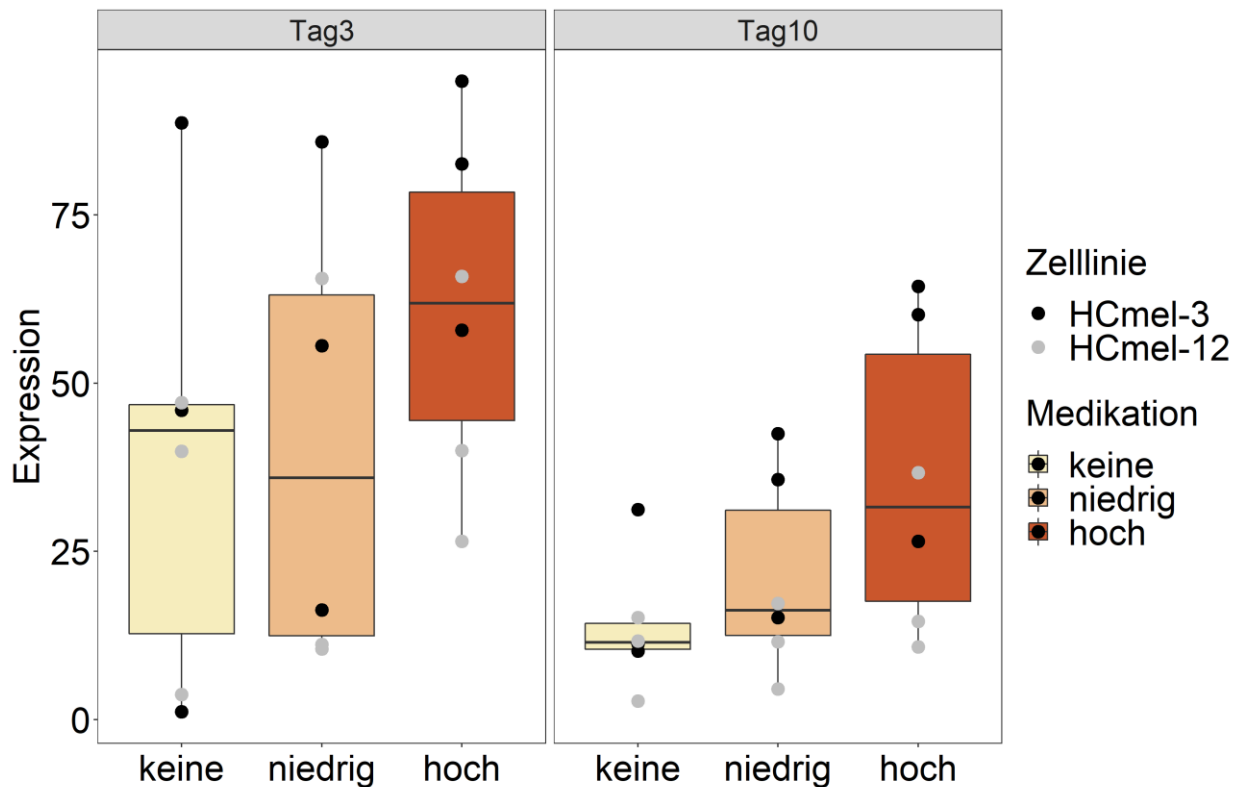


Abb. 17: Darstellung der NGFR-Expression der Zelllinien HCmel-3 (schwarze Punkte) und HCmel-12 (graue Punkte) nach Geneticin-Behandlung (niedrige Konzentration: Geneticin 2 $\mu\text{l/ml}$, hohe Konzentration: Geneticin 5 $\mu\text{l/ml}$) nach 3 Tagen und nach 10 Tagen. Nach 3 Tagen (links), sowie nach 10 Tagen (rechts) Behandlung ist ein Anstieg der NGFR-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (nt) zu erkennen. Der Effekt ist bei beiden Zelllinien signifikant und bei der Behandlung mit hoher Konzentration stärker ausgeprägt ($p < 0,1$).

Zusammen betrachtet unterstützen die Ergebnisse die Hypothese, dass Melanomzellen unter Stress-induzierenden Kulturbedingungen, wie einer Chemotherapie, dedifferenzieren können. Aufgrund der geringen Anzahl an Versuchswiederholungen ($n=3$), sowie unterschiedlichen Ausgangswerten und insgesamt großen Schwankungen, hat die statistische Auswertung hier eine begrenzte Aussagekraft.

Das gemischte lineare Regressionsmodell gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Medikation einen Einfluss auf die NGFR-Expression hat. Um diesen Effekt zu verifizieren und weiter zu quantifizieren, sind weitere Studien in größerem Umfang unter Berücksichtigung weiterer Faktoren notwendig.

Diese Dedifferenzierung scheint reversibel und dynamisch zu sein, da die NGFR-Expression nach einer längeren Behandlungspause wieder sinkt (Daten nicht dargestellt). Auch in der Kontrollgruppe sinkt die NGFR-Expression nach 10 Tagen Behandlungspause. Möglicherweise führt die Behandlung (auch mit Nährmedium) zu einer leicht erhöhten NGFR-Expression (stressinduziert), die nach einer Behandlungspause wieder abnimmt.

Demnach kommt es ohne weitere Behandlung der Melanom-Zelllinien zu einer Redifferenzierung und Wiederherstellung des ursprünglichen Gleichgewichtes differenzierter und weniger differenzierter Zellen (analog zu den makroskopischen Beobachtungen). Chemotherapeutika sind wahrscheinlich neben TNF weitere Einflussfaktoren auf die Differenzierung von Melanomzellen *in vitro*.

3.3 Die Dedifferenzierung der Melanomzellen ist nicht durch Proliferation oder Zelltod begründet, sondern durch dynamische Differenzierungsmarker-Expression

Die in 3.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen eine Dedifferenzierung der Melanomzellen durch das Chemotherapeutikum Geneticin. Es kann jedoch anhand der bisherigen Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass die veränderten Expressionsmuster durch die Selektion eines besonders überlebensfähigen Subklons in der Population begründet ist. Auch könnte massive, durch Geneticin induzierte Apoptose in der Zellpopulation dazu führen, dass eine Gruppe Chemotherapie-resistenter Subklone die Behandlung überlebt, die weniger differenziert ist und schon seit Beginn des Experiments mehr NGFR exprimiert.

Um dies auszuschließen, wurden Zellzyklusanalysen von allen behandelten und unbehandelten Zellen durchgeführt. Hierzu wurde die DNA der Zellen mittels DNA-interkalierendem Farbstoff (Propidium Iodid) angefärbt. In der durchflusszytometrischen Untersuchung stellen sich die Zellen anhand der fluoreszierenden DNA dar und zwar proportional zum DNA-Gehalt der Zelle, sodass anhand des DNA-Gehaltes (einfacher bis zweifacher Chromosomensatz) auf die Zellzyklusphase geschlossen werden kann, in der sich die Zelle befindet.

Zellen in der G1-Phase (Wachstumsphase) haben einen einfachen Chromosomensatz und werden darum links im Histogramm abgebildet. Zusätzlich gibt es eine Ruhephase

G0, die anhand des DNA-Gehaltes nicht von der G1-Phase zu unterscheiden ist. Zellen, die sich in der G2-Phase (Wachstum, Vorbereitung auf Mitose) befinden, haben zwei Chromosomensätze und stellen sich deshalb rechts im Histogramm dar. Zellen in der M-Phase (Mitosephase, Zellteilung) teilen sich und sind anhand des DNA-Gehalts kaum von denen in der G2-Phase zu unterscheiden. Dazwischen liegen die Zellen in der S-Phase (DNA-Replikation/Synthese), die ein bis zwei Chromosomensätze enthalten. Zusätzlich sind links von der G1-Phase Zellen in der SubG1-Phase zu sehen, diese enthalten durch Apoptose-Vorgänge degradierte DNA-Fragmente.

In den durchgeführten Zellzyklusanalysen zeigen sich nach 3 Tagen Geneticin-Behandlung maximal 5,2 % der HCmel-3-Zellen und maximal 12,2 % der HCmel-12-Zellen apoptotisch. Mit steigender Konzentration des Chemotherapeutikums Geneticin, wächst die SubG1-Population, jedoch bei der Zelllinie HCmel-3 nicht signifikant und nur bei Behandlung der Zelllinie HCmel-12 mit Geneticin in hoher Konzentration signifikant ($p < 0,05$). Da der Wert 12,2 % nicht übersteigt, kann ausgeschlossen werden, dass die erhöhte NGFR-positive Population durch Apoptose der weniger NGFR-positiven Zellen begründet ist.

Der Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase, unter denen auch die ruhenden, nicht proliferierenden Zellen sind, ändert sich bei den HCmel-3-Zellen durch die Geneticin-Behandlung kaum und liegt zwischen 49 und 80 %. In der HCmel-12-Population nimmt der Anteil der Zellen mit einfachem Chromosomensatz (G0/G1-Phase) durch die Geneticin-Behandlung ab und liegt zwischen 40,9 und 55,2 %. Da sich durch die Geneticin-Behandlung nicht deutlich mehr Zellen in der S-/ G2/M-Phase befinden, ist eine erhöhte NGFR-Expression durch Proliferation eines NGFR-positiven Subklones unwahrscheinlich. Dies wird aus den durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen, dargestellt in den Histogrammen in Abb. 19 und 20, deutlich.

Zusammenfassend kann die Hypothese, dass die veränderte Expression von Differenzierungsmarkern nicht auf die Selektion oder Proliferation einer bestimmten Subpopulation zurückzuführen ist, angenommen werden.

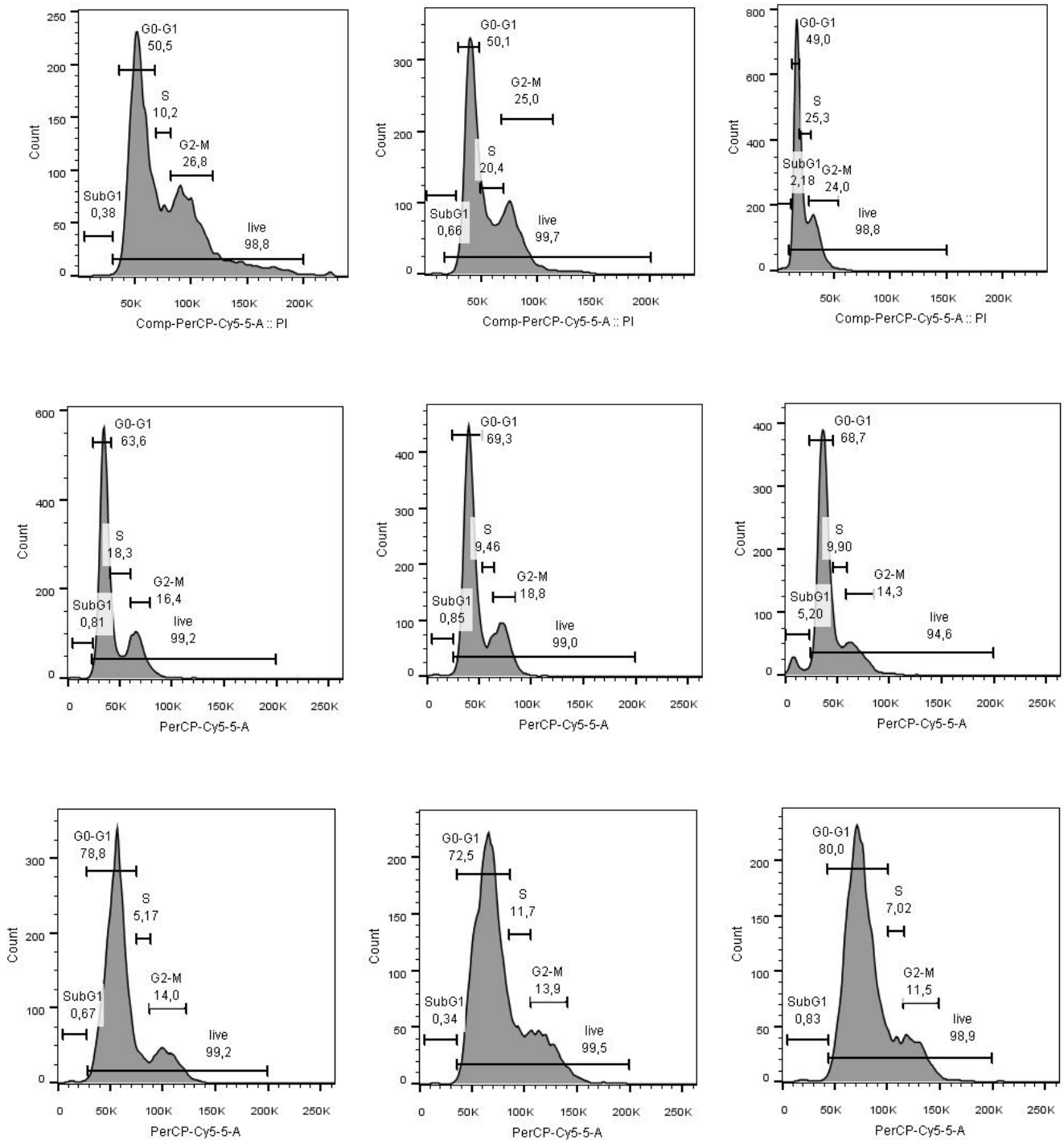


Abb. 18: Zellzyklusanalysen HCmel-3, 3 Tage nach Geneticin-Behandlung, Versuche 1 (oben) bis 3 (unten). Repräsentative Histogramme: Der Anteil der Zellen in der SubG1-Phase (enthalten defragmentierte DNA = apoptotische Zellen) nimmt durch die Geneticin-Behandlung nicht signifikant zu (links: unbehandelt, Mitte: 2 µl/ml Geneticin, rechts: 5 µl/ml Geneticin) (n=3).

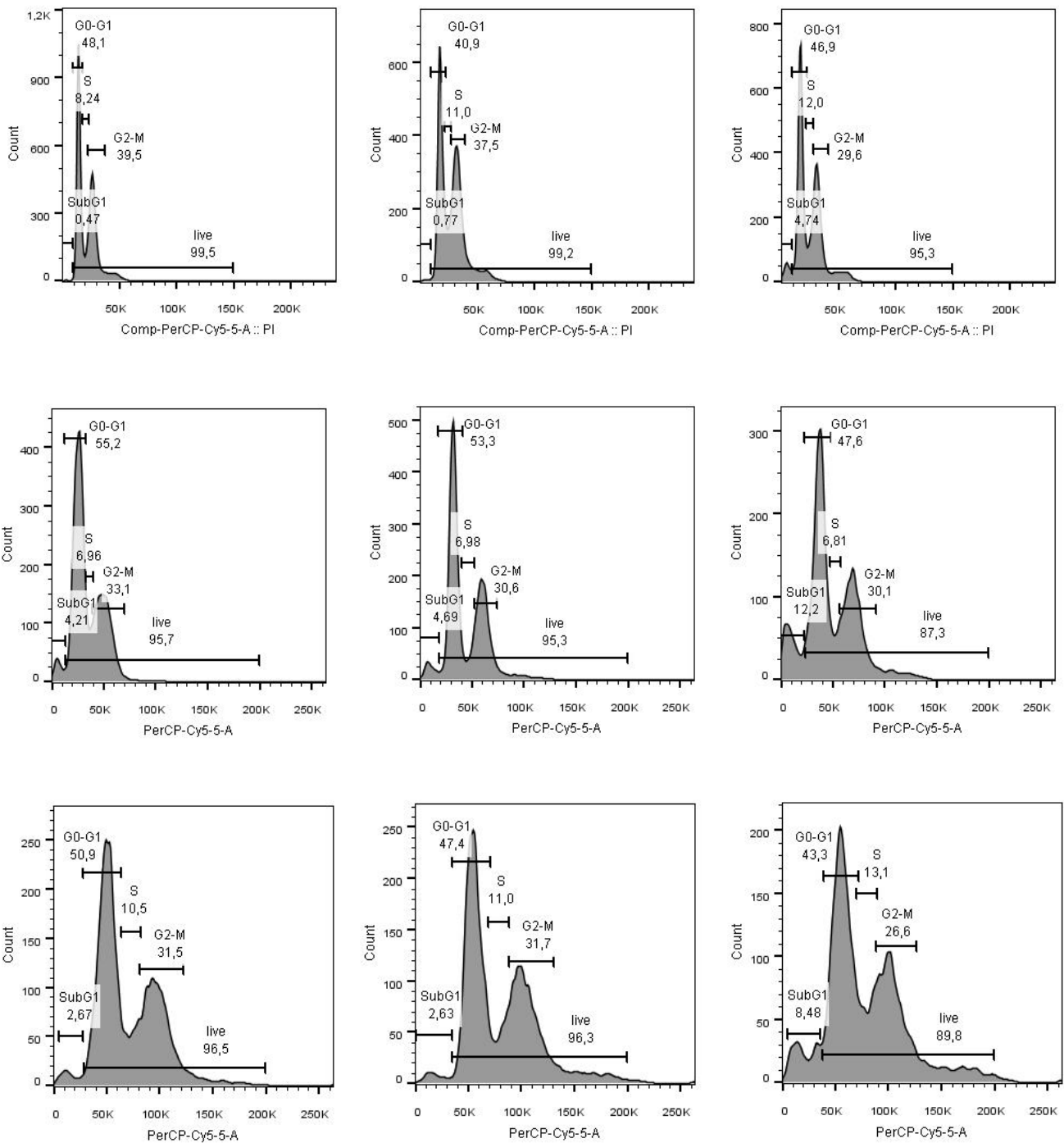


Abb. 19: Zellzyklusanalysen HcMel-12, 3 Tage nach Geneticin-Behandlung, Versuche 1 (oben) bis 3 (unten). Der Anteil der Zellen in der SubG1-Phase (enthalten defragmentierte DNA = apoptotische Zellen) nimmt durch die Geneticin-Behandlung bei niedriger Konzentration nicht signifikant zu, bei hoher Konzentration signifikant zu (links: unbehandelt, Mitte: 2 µl/ml Geneticin, rechts: 5 µl/ml Geneticin) (n=3, p<0,05)

4. Diskussion

4.1 Heterogenität der Melanomzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde die Heterogenität von Melanomzellen bezüglich Morphologie und Differenzierung *in vitro* untersucht sowie deren Beeinflussung durch eine Chemotherapie.

Ich konnte zeigen, dass sich Morphologie und die Expression Differenzierungsmarker der Mausmelanom-Zelllinien durch eine Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Geneticin beeinflussen lassen. Eine Zunahme weniger pigmentierter und spindelförmiger Zellen sowie ein partieller Verlust von gp100 bei einer Zunahme der NGFR-Expression wurde als Dedifferenzierung gewertet.

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem genetisch erzeugten Mausmodell Hgf-Cdk4 erzeugt, bei dem primäre Melanome in der Haut entstehen. Diese Versuchsbedingungen brachten den Vorteil, dass Einflussfaktoren auf die Differenzierung von Melanomzellen *in vitro* ohne systemische Einflüsse oder Wechselwirkungen z.B. mit Immunzellen untersucht werden konnten. Da die Mechanismen der Genregulation und Zelldifferenzierung nicht vollständig geklärt sind, bleibt unklar, welche Faktoren neben der Behandlung mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin Einfluss auf die Zelldifferenzierung nehmen. Ein besseres Verständnis dieser wäre hilfreich um vergleichbarere Ergebnisse zu produzieren. Andere Methoden wie beispielsweise RNA-Seq (Wang et al. 2009) bieten die Möglichkeit die Genexpressionslevel von Tumorzellen unter verschiedenen Einflüssen zu quantifizieren und stellen somit eine exaktere Untersuchungsmethode dar.

Nachteilig an meiner Arbeit ist, dass aufgrund der geringen Anzahl an Versuchswiederholungen die statistische Power gering ist und die Aussage der statistischen Berechnungen somit begrenzt bleibt. Mittels linearem Regressionsmodell konnte ein statistisch signifikanter und konzentrationsabhängiger Einfluss der Geneticin-Behandlung auf die Zell-Differenzierung nachgewiesen werden. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0,1$ gewählt. Dies ist in Übereinstimmung mit Kim und Choi (2019) sowie Thiese et al. (2016), welche ein höheres Signifikanzniveau bei kleiner Stichprobengröße als zulässig ansehen. Insbesondere, da es sich um eine explorative Studie handelt. Zukünftige Studien mit mehr

Versuchswiederholungen und besser kontrollierten Zellkulturbedingungen sind erforderlich, um die Hypothese zu untermauern. Das konditionale R^2 für das gemischte lineare Regressionsmodell verdeutlicht mit einem Wert von 60,2 % eine Korrelation von Medikation und NGFR-Expression.

Des Weiteren ist die eingeschränkte Übertragbarkeit auf die Situation in vivo nachteilig und kann nur in anderen Versuchsmodellen untersucht werden.

Durch die Anwendung verschiedener Methoden (Lichtmikroskopie, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie) auf die gleiche Fragestellung (Expression der Differenzierungsmarker), ließ sich in Zusammenschau der Ergebnisse der Trend zur Dedifferenzierung nach Geneticin-Behandlung verdeutlichen.

4.2 Modelle der Tumorentstehung und Heterogenität

Es existieren unterschiedliche Erklärungsmodelle für die Entstehung maligner Tumoren, woraus sich Ursachen für die Heterogenität ableiten lassen.

Die Eigenschaften von Tumorzellen fortgeschrittener Tumoren ähneln in verschiedenen Eigenschaften denen von Stammzellen. Hierzu zählen Selbsterneuerung und phänotypische Plastizität. Auch haben Tumorzellen häufig die gewebespezifische Differenzierung verloren. Das legt die Vermutung nahe, dass Tumorzellen entweder aus diesen Vorläuferzellen entstehen oder im Verlauf der Tumorprogression diese Eigenschaften im Sinne einer Dedifferenzierung zurückerlangen (Ben-Porath et al. 2008). Nach dem stochastischen Tumormodell ist Heterogenität auf diverse genetische Chromosomen-Aberrationen der tumorinitiierenden Zellen und auf phänotypische Variation innerhalb der Tumorzellpopulation zurückzuführen, auf die eine Selektion der überlebensfähigsten Zellklone folgt (Mrusyk et al. 2012).

Nach dem Modell der Tumor-Stammzellen existieren Tumorsubpopulationen, die besondere Stammzeleigenschaften aufweisen, wie die Expression von Vorläufer-Antigenen sowie die Fähigkeit, neue heterogene Tumoren zu initiieren. Nach diesem Modell entsteht die Heterogenität, indem sich Tumorstammzellen zu mehr und weniger differenzierten Zellen entwickeln, die im Tumor nebeneinander vorliegen (Dalerba et al. 2007).

Diese sogenannten Tumorstammzellen könnten somit als Angriffspunkt für Antitumorthérapien dienen, dies wurde mehrfach zu charakterisieren versucht. Boiko et

al. (2010) definieren eine Population von Tumorstammzellen, die heterogen NGFR/CD271 exprimiert (in 9 von 10 Melanomen, 2,5-41 % der gesamten Tumorzellpopulation) und in Transplantationsversuchen in Nacktmäusen signifikant häufiger zu Tumorentwicklung führt. Ähnlich beschreiben Civenni et al. (2011) eine CD271-exprimierende Tumorzellpopulation, die in immunkompromittierten Mäusen häufiger zu Melanomentwicklung führt. Held et al. (2010) definieren hingegen eine NGFR-negative Population, die sich als besonders tumorigen und Chemotherapie-resistent darstellt, die sie „Melanoma propagating cells“ nennen. Zusammenfassend konnte bislang keine Population innerhalb eines Melanoms eindeutig als Tumorstammzellpopulation definiert werden.

Ein weiteres Modell, das Heterogenität in Melanomen erklärt, ist ein dynamisches Modell, nach dem Tumorzellen reversibel zwischen verschiedenen Phänotypen wechseln können und somit beispielsweise zwischen einem proliferativen oder invasiven Phänotyp wechseln können (Vandamme und Berx 2014).

Da die untersuchten Melanom-Zelllinien nach den vorliegenden Ergebnissen dynamisch die Expression von NGFR verändern können, spricht dieses Ergebnis gegen eine durch ihre NGFR-Expression definierbare Stammzellpopulation. Unterstützt wird dies durch die Arbeiten von Quintana et al. (2010), die keine definierbare abgrenzbare Stammzellpopulation finden und ein dynamisches Tumormodell in Betracht ziehen, nach dem die Zellen differenzieren und dedifferenzieren können. Rosen und Jordan (2009) beschreiben die Tumormikroumgebung (Extrazellularraum, Fibroblasten, Endothelzellen) sowie das Immunsystem als entscheidende Einflussfaktoren von Heterogenität und Tumorprogression. Auch Vandamme und Berx (2014) beschreiben einen dynamischen Wechsel zwischen einem invasiven und differenzierten Phänotyp von Melanomzellen. Über die MITF Signaltransduktion wird der Phänotyp durch Tumormikroumgebungsfaktoren wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren, Inflammation und durch Zell-intrinsische Faktoren (onkogene Signale, genetische Instabilität) beeinflusst. Ein wichtiger Regulationsmechanismus hierfür ist die Expression des melanozytären Transkriptionsfaktors MITF (Carreira et al. 2006). Eine niedrige MITF Expression führt in Melanomzellen zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und somit zu einem G1-Arrest, Tumorzellen entwickeln Stammzell-Eigenschaften und eine erhöhte Invasivität

(Sáez-Ayala et al. 2013), ohne dass es einer erhöhten Apoptoserate kommt. Durch mittlere MITF Level nehmen Melanomzellen eine rundlichere Zellform an und es kommt zu vermehrter Proliferation. Eine hohe MITF Expression führt zur Expression von Differenzierungsmarkern (Riesenberg et al. 2015).

Diese Faktoren müssen in weiteren in vivo Experimenten untersucht werden.

In der Zusammenschau können Melanomzellen Differenzierungsmarker heterogen und dynamisch exprimieren, Vorläufer-Antigene wie NGFR können somit nicht als statische Tumorstammzellen-definierende Marker herangezogen werden, sondern ihre Expression muss eher als dynamische Reaktion auf Umgebungsbedingungen gelten. Dennoch kann eine erhöhte NGFR-Expression mit Eigenschaften von Vorläuferzellen, wie zum Beispiel Zellmigration und Tumorprogression, assoziiert sein (Zubrilov et al. 2015).

4.3 Regulationsmechanismen exprimierter Antigene / Entdifferenzierung und Therapieresistenz

Einer Entdifferenzierung von Tumorzellen, also der verminderten Expression melanozytärer Differenzierungsantigene und der erhöhten Expression von Vorläufer-Zell-Antigenen, können unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

Auf der einen Seite können genetische Mutationen in Tumorzellen zu einem Verlust gewebespezifischer Differenzierungsantigene führen. Obwohl Melanomzellen in der Regel mehrere melanozytäre Antigene, wie zum Beispiel Tyrosinase, MART-1 und gp100, exprimieren, treten Varianten mit komplettem Verlust dieser Antigene trotz intakter MHC-Expression und Antigen-Prozessierung auf (Slingluff et al. 2000). Dieser Antigen-Verlust verhindert die Erkennung der Antigene durch zytotoxische T-Zellen und die folgende Lyse von Tumorzellen.

Ein weiterer beschriebener Mechanismus, der T-Zell-Erkennung zu entgehen, ist eine Mutation, die zu einem veränderten β 2-Mikroglobulin führt, woraus ein kompletter MHC-I-Verlust resultiert, sodass melanozytäre Antigene nicht präsentiert werden können (Rosenberg et al. 2003).

Auf der anderen Seite können epigenetische (dynamische) Regulationsmechanismen zu einer Entdifferenzierung führen. Wie in der vorliegenden Arbeit untersucht, werden Differenzierungs-Antigene von den Melanom-Zellen heterogen exprimiert und durch

Umgebungsbedingungen, wie eine Geneticin-Behandlung, beeinflusst (in Abb. 11-16 dargestellt).

In der Arbeit von Landsberg et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass TNF α als immunstimulierendes Zytokin zu solch einer Entdifferenzierung von Melanomzellen mit erhöhter NGFR-Expression führt.

Auch das Zytokin TGF β initiiert in Melanomzellen während der Tumorprogression und Metastasierung den Übergang in einen weniger differenzierten Phänotyp. Dieser zeichnet sich durch Wechsel von einer dendritischen zu einer rundlicheren Zellform, verstärkte Motilität und verminderte Pigmentierung aus, wobei dieser Phänotyp reversibel ist (Pinner et al. 2009).

In anderen Versuchen konnte eine Hochregulation der Melan-A und gp100 Expression nach 3-tägiger Behandlung mit dem Topoisomerase-Inhibitor Daunorubicin (100nM) gezeigt werden, wobei höhere Konzentrationen auch zu einer verminderten Antigen-Expression führten (Haggerty et al. 2011). Daunorubicin blockiert als DNA-interkalierende Substanz die Transkription und Replikation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF und IL-6 sowie Wachstumsfaktoren wie TGF β und HGF die Differenzierung beeinflussen, indem sie von den Tumorzellen selbst, aber auch von Endothelzellen und Immunzellen in der Tumormikroumgebung abgegeben werden.

Ravindran Menon et al. (2014) konnten in Ihrer Arbeit zeigen, dass auch eine Exposition der Melanomzellen mit dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib über mindestens 12 Tage zu einer veränderten Antigenexpression im Sinne einer Entdifferenzierung mit verstärkter NGFR-Expression führt. Nach längerer Behandlung über 58 Tage konnten sie hingegen eine verminderte NGFR Expression feststellen und postulierten eine dauerhafte Resistenz der Zellen für den BRAF-Inhibitor Vemurafenib.

Die vorliegende Arbeit legt nahe, dass es weitere Ursachen für diese Entdifferenzierung von Melanomzellen geben kann, zum Beispiel eine Antibiotikabehandlung oder Chemotherapie. Geneticin stellt wie TNF einen Stressfaktor für die Melanomzellen dar, worauf diese mit einer veränderten Expression ihrer Oberflächenantigene reagieren. Ursächlich für diesen reversiblen Wechsel des Phänotyps sind vermutlich Änderungen in

Transkriptions- und Replikations-Signalwegen anstelle von Genmutationen, die irreversible Phänotypveränderungen zur Folge hätten.

Auch Ravindran Menon et al. (2014) beobachteten eine reversible therapieinduzierte Zunahme der NGFR-Expression der Melanomzellen und eine Abnahme der NGFR-Expression nach einer Behandlungspause.

In weiteren Arbeiten bleibt zu klären, welche weiteren Faktoren Auswirkungen auf die Differenzierungsmarker-Expression haben und welche Mechanismen zugrunde liegen. Da die Antigen-Expression in den Untersuchungen auch unabhängig von der Chemotherapie stark variierte, stehen auch Zellkulturbedingungen wie Hypoxie, Nährstoffmangel oder andere Stress-induzierende Faktoren in Verdacht, die Antigen-Expression und den Differenzierungsstatus zu beeinflussen.

Durch die dynamische Reaktion auf Änderungen des Tumormikromilieus können Tumorzellen unabhängiger von den Umgebungsbedingungen wachsen oder kurzzeitig resistent für Antitumor-Therapien wie Immuntherapien, Chemotherapien oder targeted therapies werden (Hölzel et al. 2013). Diese phänotypische Plastizität ermöglicht Melanomzellen somit eine Migration in andere Gewebe, führt zu Metastasierung und Therapieresistenz. Des Weiteren bleibt offen, inwiefern diese in vitro-Beobachtung sich in vivo bestätigen wird.

4.4 Relevanz für Klinik und Therapie

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass Melanom-Zelllinien morphologisch heterogen erscheinen und ein heterogenes Expressionsmuster von Differenzierungsmarkern zeigen. De Vries et al. (1997) beschrieben die Expression von gp100 und weiteren melanozytären Antigenen schon früher als sehr heterogen und infolgedessen bedeutungsvoll für die Tumorthherapie, da sich einige Zelllinien ohne Expression einzelner oder mehrerer melanozytärer Antigene darstellten. Unter den Therapiestrategien gegen fortgeschrittene Melanome finden sich viele, die an den von Tumorzellen exprimierten Differenzierungsantigenen angreifen. Immun-Therapien setzen voraus, dass die T-Lymphozyten Tumorzellen durch spezifische Antigene erkennen. Dies gilt für die T-Zell-Antwort stimulierende Antikörper wie anti-CTLA-4 und anti-PD-1 genauso wie für adoptiven T-Zell-Transfer und Vakzinierungsstrategien (Coulie et al. 2014). Mechanismen, wie Tumorzellen dieser Erkennung entgehen können, führen

deshalb zu Therapie-Misserfolgen und Resistenzen im Therapieverlauf. Dazu gehören ein kompletter Verlust der MHC-Expression, Antigen-Verlust bei intakter MHC-Expression und das Fehlen kostimulatorischer Signale, die zur T-Zell-Aktivierung nötig sind (Maeurer et al. 1996).

Für die Entwicklung von Therapien bedeutet dies, dass sie nicht allein gegen einzelne Differenzierungsantigene gerichtet sein sollen, da diese entweder durch genetische Mutationen verloren gehen oder, wie in der Arbeit gezeigt, dynamisch reguliert werden können und somit keinen zuverlässigen Ansatzpunkt bieten. Ein breiterer Ansatz mit mehreren Zielantigenen könnte eine wirkungsvollere Therapiestrategie darstellen. Ein aufwendigerer Ansatz wäre, die zu therapierenden Melanome vorher auf ihre Antigen-Expression zu testen und eine individuelle Therapie gegen nachgewiesene Antigene zu etablieren (Parmiani et al. 2007), auch wenn diese im Verlauf reevaluiert werden müsste, um auf einen Antigen-Verlust reagieren zu können. Solche Chemotherapeutika, die zu einer erhöhten Antigen-Expression oder zu einem Antigen-Verlust führen, könnten therapeutisch genutzt werden, um Tumorzellen das in der Therapie verwendete Antigen hochregulieren zu lassen (Horn et al. 2018). Dabei bleibt zu beachten, dass ein Verlust der Antigen-Expression durch Stressfaktoren wie Chemotherapien früher eintreten kann, sodass Resistenzen schneller auftreten könnten. Auf der anderen Seite kann die dynamische Regulation von Zielantigenen auch zu einem Wiederansprechen auf ein Medikament nach einer Therapieresistenz führen, wie von Schreuer et al. (2017) für BRAF Inhibitoren gezeigt werden konnte. Ein besseres Verständnis dieser Einflussfaktoren auf die Plastizität und Resistenzmechanismen von Melanomzellen ist notwendig, um zukünftige Antitumorthérapien zu etablieren und Resistenzen zu vermeiden.

5. Zusammenfassung

Das fortgeschrittene Melanom stellt eine besondere therapeutische Herausforderung dar, die sich insbesondere auch in seiner Heterogenität begründet. Mausmelanom-Zelllinien weisen große Unterschiede bezüglich Morphologie, Pigmentierung, Wachstumsverhalten, Proliferation und Differenzierungsstatus auf. Ursächlich sind genetische Mutationen, variable epigenetische Veränderungen wie Genregulierung sowie gewebespezifische Differenzierung und die Reaktion auf Umgebungsfaktoren. Mittels Fotodokumentation, Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Durchflusszytometrie konnte die Heterogenität der aus primären oder seriell transplantierten Mausmelanomen von Hgf-CDK4-Mäusen generierten Zelllinien HCmel-3 und HCmel-12 dargestellt werden. Es wurde gezeigt, dass die Morphologie sowie Expression von Differenzierungsmarkern dynamisch reguliert werden und somit nicht als zuverlässige Marker für „Tumorstammzellen“ herangezogen werden können. Chemotherapeutika wie Geneticin könnten ähnlich wie TNF einen Stressfaktor darstellen, unter dem Melanomzellen dedifferenzieren, d.h. melanozytäre Differenzierungsmarker vermindert und Marker der Neuralleistenzellen NGFR verstärkt exprimieren. Durch Zellzyklusanalysen wurde ausgeschlossen, dass die veränderte Expression der Marker auf die Selektion eines Subklons bei massivem Zelluntergang oder extremer Proliferation eines fitten Zellklons zurückzuführen ist. Die These, dass Melanomzellen in der Lage sind, die Differenzierungsmarker dynamisch an- und abzuschalten, wurde somit untermauert.

Die klinische Übertragbarkeit ist durch die Versuchsbedingungen in vitro eingeschränkt. Dennoch lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass Differenzierungsantigene nur begrenzt eine Zielstruktur für Antitumortherapien bieten können und möglichst vorher untersucht und im Therapieverlauf angepasst werden sollten. Umgekehrt kann die dynamische Regulation von Zellphänotyp und Differenzierungssignatur auch für eine Kombinationstherapie genutzt werden oder zu einem Wiederansprechen auf Medikamente nach einer Behandlungspause nach Therapieresistenz führen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zelllinie HCmel-3 (links) und HCmel-12 (rechts)	16
Abb. 2: HCmel-3 pigmentierter (links) und heller Klon (rechts)	16
Abb. 3: Halblogarithmische Verdünnungsreihe	17
Abb. 4: HCmel-3 mit den unterschiedlichen Zellpopulationen, hier nach Einzel-Zell-Klonierung dargestellt. Links: Zellen mit rundlicherer Zellform, kaum pigmentiert und mit sternförmigen Ausläufern.	22
Abb. 5: Unterschiedliche Morphologie (Zellform und Pigmentierung) der Zelllinien HCmel-3 (links) und HCmel-12 (rechts)	24
Abb. 6: Proliferations-Assay der Zelllinien HCmel-12 und HCmel-3 im Vergleich, nach 24 Stunden Wachstum	25
Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien HCmel-3 (links) und HCmel-12 (rechts) mit Anfärbung von HMB45(Alexa488-grün) und NGFR (Cy3-rot), Zellkerne (DAPI-blau)	285
Abb. 8: Durchflusszytometrie: Erhöhung der NGFR-Expression durch TNF-Behandlung (24 Std.) bei den Zelllinien HCmel-3 (oben) und HCmel-12 (unten)	27
Abb. 9: XTT-Assay zeigt die unterschiedliche Sensitivität der Melanomzelllinien HCmel-3 und HCmel-12 für Mafosamid, Doxorubicin, Vinblastin und Paclitaxel. Die Sensitivität der Zelllinien für die Behandlung unterscheidet sich deutlich.	28
Abb. 10: Schematische Darstellung der Geneticin-Behandlung, Zeitpunkt der Analyse	30
Abb. 11: Zelllinie HCmel-3 nach 3 Tagen Behandlung, oben unbehandelte Kontrolle, mittig Geneticin in Konzentration 2µl/ml, unten Geneticin Konzentration 5µl/ml., Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (Versuch1)	31
Abb. 12: Zelllinie HCmel-3 nach 3 Tagen Geneticin-Behandlung, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (Versuch3)	32
Abb. 13: Zelllinie HCmel-12 nach 3 Tagen Geneticin-Behandlung, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (Versuch1)	33
Abb. 14: Zelllinie HCmel-12 nach 3 Tagen Geneticin-Behandlung, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (Versuch3)	33
Abb. 15: Zelllinie HCmel-3 nach 10 Tagen Geneticin-Behandlung, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (Versuch1)	34

Abb. 16: Zelllinie HCmel-12 nach 10 Tagen Geneticin-Behandlung, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (Versuch 1) 35

Abb. 17: Darstellung der NGFR-Expression der Zelllinien HCmel-3 (schwarze Punkte) und HCmel-12 (graue Punkte) nach Geneticin-Behandlung (niedrige Konzentration: Geneticin 2µl/ml, hohe Konzentration: Geneticin 5µl/ml) nach 3 Tagen und nach 10 Tagen. Nach 3 Tagen (links), sowie nach 10 Tagen (rechts) Behandlung ist ein Anstieg der NGFR-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (nt) zu erkennen. Der Effekt ist bei beiden Zelllinien signifikant und bei der Behandlung mit hoher Konzentration stärker ausgeprägt ($p < 0,1$). 36

Abb. 18: Zellzyklusanalysen HCmel-3, 3 Tage nach Geneticin-Behandlung, Versuche 1 (oben) bis 3 (unten). Der Anteil der Zellen in der SubG1-Phase (enthalten defragmentierte DNA = apoptotische Zellen) nimmt durch die Geneticin-Behandlung und in Abhängigkeit von der Konzentration zu. 40

Abb. 19: Zellzyklusanalysen HCmel-12, 3 Tage nach Geneticin-Behandlung, Versuche 1 (oben) bis 3 (unten). Der Anteil der Zellen in der SubG1-Phase (enthalten defragmentierte DNA = apoptotische Zellen) nimmt durch die Geneticin-Behandlung und in Abhängigkeit von der Konzentration zu. 41

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Reagentien	13
Tab. 2: Verwendete Antikörper FACS	14
Tab. 3: Verwendete Antikörper Immunfluoreszenz	15

8. Literaturverzeichnis

Anichini A, Fossati G, Parmiani G. Heterogeneity of Clones from a Human Metastatic Melanoma detected by Autologous Cytotoxic T Lymphocyte Clones. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 215-220

Balch, CE. Final Version of the American Joint Committee on Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19: 3635-3648

Beddingfield FC. The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. *Oncologist* 2003; 8: 459-465.
Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genetics* 2008; 40: 499–507

Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP, Weissman IL. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 2010; 466: 133-137

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970; 172: 902–908

Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, Testori A, Larue L, Goding CR. Mitf regulation of DIA1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.* 2006; 20: 3426-3439

Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol.* 2000; 323-331

Cheli Y, Bonnazi VF, Jaquel A, Allegra M, De Donatis GM, Bahadoran P, Bertolotto C, Balotti, R. CD271 is an imperfect marker for melanoma initiating cells. *Onkotarget* 2014; 5272-5283

Civenni G, Walter A, Kobert N, Mihic-Probst D, Zipser M, Belloni B, Sommer L. Human CD271-Positive Melanoma Stem Cells Associated with Metastasis Establish Tumor Heterogeneity and Long-term Growth. *Cancer Res.* 2011; 71: 3098-3109

Cosgarea I, Ritter C, Becker JC, Schadendorf D, Ugurel S. Update on the clinical use of kinase inhibitors in melanoma. *JDDG* 2017; 887-893

Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumor antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews* 2014; 14: 135-146

Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard, VH, Hunt DF, Slingluff CL. Identification of a Peptide Recognized by Five Melanoma-Specific Human Cytotoxic T Cell Lines. *Science*, 1994; 264: 716-719

Dalerba P, Cho R, Clarke MF. Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annu Rev Med.* 200; 58: 267-284

De Vries TJ., Fourkour A, Wobbes T, Verkroost G, Ruiter DJ, Muijen GN. Heterogeneous Expression of Immunotherapy Candidate Proteins gp100, MART-1, and Tyrosinase in Human Melanoma Cell Lines and in Human Melanocytic Lesions. *Cancer Res.* 1997; 57: 3223-3229

Flaherty KT. Targeting Metastatic Melanoma. *Annu Rev Med.* 2012; 63: 171-183.

Haggerty TJ, Dunn IS, Rose LB, Newton EE, Martin S, Riley JL, Kurnick JT. Topoisomerase Inhibitors Modulate Expression of Melanocytic Antigens and Enhance T Cell Recognition of Tumor Cells. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60: 133-144

Held MA, Curley DP, Dankort D, McMahon M, Muthusamy V, Bosenberg MW. Characterization of Melanoma Cells Capable of Propagating Tumors from a Single Cell. *Cancer Res.* 2010; 70: 388-397

Hölzel M, Bovier A, Tüting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 365-376

Horn L, Mansfield AS, Szczęśna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, Huemer F, Losonczy G, Johnson ML, Nishio M, Reck M, Mok T, Lam S, Shames DS, Liu J, Ding B, Lopez-Chavez A, Kabbinavar F, Lin W, Sandler A, Liu SV. Atezolizumab plus Chemotherapy in Small-Cell Lung Cancer 2019; *N Engl J Med*; 380: 888-890

Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophins and cell death. *Exp Cell Res* 2012; 318: 1221-1228

Jiang Y, Chen G, Zhang Y, Lu L, Liu S, Cao X. Nerve Growth Factor Promotes TLR4 Signaling-Induced Maturation of Human Dendritic Cells In Vitro through Inducible p75NTR 1. *J Immunol.* 2007; 179: 6297-6304

Kim JH, Choi I. Choosing the level of significance: a Decision-theoretic approach. *Abacus* 2019; 1-53

Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, Fatho M, Lennerz V, Wölfel T, Hölzel M, Tüting, T. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 2012; 490: 412-418

Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* 2014; 346: 945-949

Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14(8): 1-20

Maeurer MJ, Gollin SM, Storkus WJ, Swaney W, Karbach J, Martin D, Castelli C, Salter R, Knuth A, Lotze MT. Tumor Escape from Immune Recognition: Loss of HLA-A2 Melanoma Cell Surface Expression Is Associated with a Complex Rearrangement of the Short Arm of Chromosome 6. *Clin Cancer Res.* 1996; 2: 641-652

McDermott D, Lebbé C, Hodi FS, Maio M, Weber JS, Wolchok JD, Thompson JA, Balch CM. Durable Benefit and the potential for long-term survival with immunotherapy in advanced melanoma. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40: 1056-1064

Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, Osokawa K, Honda MJ. (2011). CD271/p75NTR Inhibits the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Oncogenic, Adipogenic, and Myogenic Lineages. *Stem Cells Dev.* 2011; 20: 901-913

Mrusyk A, Almedro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity; a looking glass for cancer? *Nature* 2012; 12: 323-334

National Cancer Institute. Cancer Statistics Factsheets: Melanoma of the Skin. Surveillance Research Program 2013

Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves C. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature* 2012; 12: 133-142

Ordóñez NG. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: a review and update. *Hum Pathol.* 2014; 45: 191-205
Parmiani G, Castelli C, Santinami M, Rivoltini L. Melanoma immunology: past, present and future. *Curr Opin Oncol.* 2007; 19: 121-127

Pietra G, Manzini C, Vitale M, Balsamo M, Ognio E, Boitano M, Queirolo P, Moretta L, Mingari MC. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells. *Int Immunol.* 2009; 21: 793-801

Pinner S, Jordan P, Bazley KS, Collinson L, Marais R, Bonvin E, Goding C, Sahai E. Inreavital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination. *Cancer Res.* 2009; 69: 7969-7977

Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, Morrison SJ. Phenotypic Heterogeneity among Tumorigenic Melanoma Cells from Patients that Is Reversible and Not Hierarchically Organized. *Cancer Cell* 2010; 18: 510-523

Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaiba M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In vivo* 2014; 28: 1005-1012

Ravindran Menon D, Das S, Krepler C, Vultur A, Rinner B, Schauer S, Kashofer K, Wagner K, Zhang G, Bonyadi Rad E, Haass NK, Soyer HP, Gabrielli B, Somasundaram B, Hoefler G, Herlyn M, Schaidler H. A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene* 2014; 34: 4448-4459

Robert-Koch-Institut, 2012. Häufigkeiten und Trends: Malignes Melanom der Haut. *Krebs in Deutschland 2005 - 2006*, S. 7. Auflage: 60 - 63

Rosen JM, Jordan CT. The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science* 2009; 324: 1670-1673

Rosenberg SA, Yang JC, Robbins PF, Wunderlich JR, Hwu P, Sherry RM, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Restifo NP, Filie A, Chang R, Dudley ME. Cell Transfer Therapy for Cancer: Lessons from Sequential Treatments of a Patient With Metastatic Melanoma. *J Immunother* 2003; 26: 385–393

Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, NP Restifo, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME. Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(13): 4550-4557

Rothberg BE, Moeder CB, Kluger H, Halaban R, Elder DE, Murphy GF, Lazar A, Prieto V, Duncan LM, Rimm DL. Nuclear to non-nuclear Pmel17/gp100 expression (HMB45

staining) as a discriminator between benign and malignant lesions. *Mod Pathol.* 2008; 21: 1121-1129

Sáez-Ayala M, Montenegro MF, Sánchez-Del-Campo L, Fernández-Péres MP, Chazarra S, Freter R, Middleton M, Piñero-Madrona A, Cabezas-Herrera J, Goding CR, Rodríguez-López JN. Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. *Cancer Cell* 2013; 24: 105-119

Schreuer M, Jansen Y, Planken S, Chevolet I, Seremet T, Kruse V, Neyns B. Combination of dabrafenib plus trametinib for BRAF and MEK inhibitor pretreated patients with advanced BRAFV600-mutant melanoma: an open-label, single arm, dual-centre, phase 2 clinical trial. *The Lancet Oncology* 2017; 464-472

Shackleton M. Melanoma stem cells - are there devils in the detail? *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010; 23: 693-694

Slingluff CL, Colella TA, Thompson L, Graham DD, Skipper JC, Caldwell J, Brinckerhoff L, Kittlesen DJ, Deacon DH, Oei, C, Harthun NL, Huczko EL, Hunt, DF, Darrow TL, Engelhard VH. Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation proteins: immune escape that may be overcome by targeting unique or defined antigens. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 48: 661-672

Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; 22: 3138-3151

Spagnoli GC, Adamina M, Bolli M, Weber WP, Zajac P, Marti W, Oertli D, Heberer M, Harder F. Active Antigen-specific Immunotherapy of Melanoma: from Basic Science to Clinical Investigation. *World J Surg.* 2005; 29: 692-699

Thiese MS, Ronna B, Ott U. P value interpretations and considerations. *J Thorac Dis.* 2016; 8: 928–931

Tormo D, Ferrer A, Gaffal E, Wenzel J, Basner-Tschakarjan E, Steitz J, Heukamp LC, Gütgemann I, Buettner R, Malumbres M, Barbacid M, Merlino G, Tüting T. Rapid Growth of Invasive Metastatic Melanoma in Carcinogen-Treated Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-Transgenic Mice Carrying an Oncogenic CDK4 Mutation. *Am J Pathol.* 2006; 169: 665-672

Udayakumar D, Mahato B, Gabree M, Tsao H. Genetic Determinants of Cutaneous Melanoma Predisposition. *Semin Cutan Med Surg.* 2010; 29: 190-195

Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647

Vandamme N, Berx G. Melanoma cells revive an embryonic transcriptional network to dictate phenotypic heterogeneity. *Front Oncol.* 2014; 4: 352

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(1): 57-63

Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Büschenfelde KH, Beach D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995; 1281-1284

Zubrilov I, Sagi-Assif O, Izraeli S, Meshel T, Ben-Menahem S, Ginat R, Pasmanik-Chor M, Nahmias C, Couraud PO, Hoon DS, Witz IP. Vemurafenib resistance selects for highly malignant brain and lung-metastasizing melanoma cells. *Cancer Lett* 2015; 361: 86-96

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mit ihrer Unterstützung zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Jennifer Landsberg und Frau Dr. med. Judith Sirokay für die Betreuung der Arbeit, die gute Zusammenarbeit, sowie die technische und fachliche Unterstützung.

Desweiteren danke ich Prof. Dr. med. Thomas Tüting und der Arbeitsgruppe für experimentelle Dermatologie für die interessanten und hilfreichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Bei Alina Schenk möchte ich mich für die ausführliche statistische Beratung bedanken.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben, sowie meiner Schwester Jane und meinem Mann Paul für Ihre Motivation und Hilfe danken.